

JPO3/15753

PCT/JP03/15753

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

09.12.03

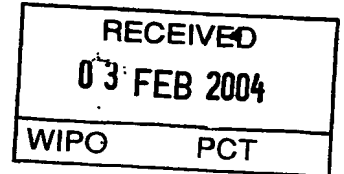
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年12月20日

出願番号  
Application Number: 特願2002-369700  
[ST. 10/C]: [JP2002-369700]

出願人  
Applicant(s): 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構



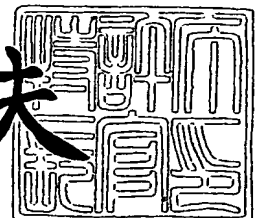
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月16日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3112139

【書類名】 特許願

【整理番号】 J102081405

【提出日】 平成14年12月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 新潟県上越市稲田 1 - 4 - 3 - 4 0 5

    【氏名】 黒田 昌治

【特許出願人】

    【識別番号】 501203344

    【氏名又は名称】 独立行政法人 農業技術研究機構

【代理人】

    【識別番号】 100078282

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 山本 秀策

【選任した代理人】

    【識別番号】 100062409

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 安村 高明

【選任した代理人】

    【識別番号】 100113413

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 森下 夏樹

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 0210886

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 種子中のタンパク質含量が低減した植物ならびにその作出法および利用法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列に相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列または該相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列に対して少なくとも約 70 % 相同な核酸配列を含む、核酸分子。

【請求項 2】 前記プロラミンポリペプチドをコードする遺伝子配列に相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】 前記プロラミンは、イネのものである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】 前記プロラミンは、ジャポニカ種のイネのものである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】 前記相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長は、少なくとも 50 の連続するヌクレオチド長である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】 前記相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列は、前記プロラミンポリペプチドをコードする全長配列の相補配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 7】 前記相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列は、前記プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列の 5' 末端のものである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 8】 前記プロラミンは、13 kDa プロラミンである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】 (a) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43 および 45 からなる群より選択される配列番号に示される核酸配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44 および 46 からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ配列を有するポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド;

(c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44 および 46 からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド;

(d) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43 および 45 からなる群より選択される配列番号に示される核酸配列からなる DNA の対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド;

(e) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44 および 46 からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはオルソログをコードする、ポリヌクレオチド;

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド; または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70% である塩基配列からなり、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
に相補的な、少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 10】 アンチセンス活性を有する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 11】 前記アンチセンス活性は、前記プロラミンポリペプチドの発現を減少させるものである、請求項 10 に記載の核酸分子。

【請求項 12】 請求項 1 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 13】 プロモーター活性を有する配列をさらに含む、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 14】 前記プロモーター活性を有する配列は、貯蔵タンパク質のプロモーターである、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 15】 前記プロモーター活性を有する配列は、前記プロラムिनのプロモーターである、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 16】 ターミネーターをさらに含む、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 17】 選択マーカーをコードする配列をさらに含む、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 18】 請求項 1 に記載の核酸分子とは異なる外来遺伝子をコードする配列をさらに含む、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 19】 請求項 1 に記載の核酸分子を含む、植物細胞。

【請求項 20】 請求項 1 に記載の核酸分子とは異なる外来遺伝子をコードする核酸分子をさらに含む、請求項 19 に記載の植物細胞。

【請求項 21】 前記プロラムिनが由来する植物種と、前記植物の種とは、同種のものである、請求項 19 に記載の植物細胞。

【請求項 22】 前記プロラムिनが由来する植物種と、前記植物の種とは、同一品種のものである、請求項 19 に記載の植物細胞。

【請求項 23】 前記プロラムिनが由来する植物種および前記植物の種は、イネである、請求項 19 に記載の植物細胞。

【請求項 24】 前記プロラムिनが由来する植物種および前記植物の種は、ジャポニカ種のイネである、請求項 19 に記載の植物細胞。

【請求項 25】 2 対の染色体の両方に、請求項 1 に記載の前記核酸分子が導入された、請求項 19 に記載の植物細胞。

【請求項 26】 請求項 19 に記載の植物細胞を含む、植物組織。

【請求項 27】 請求項 1 に記載の核酸分子を含む、植物体。

【請求項 28】 請求項 1 に記載の核酸分子とは異なる外来遺伝子をコード

する核酸分子をさらに含む、請求項 27 に記載の植物体。

【請求項 29】 前記プロラミンが由来する植物種と、前記植物の種とは、同種のものである、請求項 27 に記載の植物体。

【請求項 30】 前記プロラミンが由来する植物種と、前記植物の種とは、同一品種のものである、請求項 27 に記載の植物体。

【請求項 31】 前記プロラミンが由来する植物種および前記植物の種は、イネである、請求項 27 に記載の植物体。

【請求項 32】 前記プロラミンが由来する植物種および前記植物の種は、ジャポニカ種のイネである、請求項 27 に記載の植物体。

【請求項 33】 2 対の染色体の両方に、請求項 1 に記載の前記核酸分子が導入された、請求項 27 に記載の植物体。

【請求項 34】 請求項 27 に記載の植物体から生産された、種子。

【請求項 35】 請求項 28 に記載の植物体から生産された、種子。

【請求項 36】 請求項 27 に記載の植物体、または請求項 34 に記載の種子から生産された、デンプン調製物。

【請求項 37】 請求項 28 に記載の植物体、または請求項 35 に記載の種子から生産された、前記外来遺伝子の遺伝子産物を含む、組成物。

【請求項 38】 植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させる方法であって、

- A) 請求項 1 に記載の核酸分子を提供する工程；
  - B) 該核酸分子を該植物の細胞に導入する工程；
  - C) 該細胞を再分化させてトランスジェニック植物を作出する工程；および
  - D) 該トランスジェニック植物から種子を得る工程、
- を包含する、方法。

【請求項 39】 前記導入する工程は、アグロバクテリウム法による、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】 さらに、

- E) 前記核酸分子が導入された植物の細胞を選択する工程、
- を包含する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 4 1】 前記選択する工程は、抗生物質に対する耐性を判定することによって行われる、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】 植物種子中で外来遺伝子を発現させる方法であって、

- A) 請求項 1 に記載の核酸分子を提供する工程；
  - B) 該外来遺伝子をコードする核酸分子を提供する工程；
  - C) 該請求項 1 に記載の核酸分子および該外来遺伝子をコードする核酸分子を該植物の細胞に導入する工程；
  - D) 該細胞を再分化させてトランスジェニック植物を作出する工程；ならびに
  - E) 該トランスジェニック植物から種子を得る工程、
- を包含する、方法。

【請求項 4 3】 前記導入する工程は、アグロバクテリウム法による、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】 さらに、

- F) 前記核酸分子が導入された植物の細胞を選択する工程、
- を包含する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】 前記選択する工程は、抗生物質に対する耐性を判定することによって行われる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】 さらに

- G) 前記種子から前記外来遺伝子の遺伝子産物を分離する工程、
- を包含する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】 請求項 4 2 に記載の方法によって生産された、前記外来遺伝子の遺伝子産物を含む、組成物。

【請求項 4 8】 植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させるための、請求項 1 に記載の核酸分子の使用。

【請求項 4 9】 植物の種子中で外来遺伝子を発現させるための、請求項 1 に記載の核酸分子の使用。

【請求項 5 0】 前記種子中における前記植物の天然のタンパク質発現が低減している、請求項 4 9 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、植物の機能改良に関する。より詳細には、本発明は、貯蔵タンパク質の発現を低減させる方法および外来タンパク質を効率よく発現させる方法ならびにそれらに使用するアンチセンス構築物、組成物、装置などに関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

イネなどの穀物を含む植物の機能改良は、植物の遺伝子操作技術の進歩とともに、顕著な進展を見せている。当初は病虫害抵抗性や除草剤耐性など、主に農家を対象とした栽培面における改良が進められたが、最近ではむしろ、消費者にアピールできる要素の大きい食用部分の形質変換に力が入れるようになってきている。様々な生理機能ペプチドや抗体のような外来機能性タンパク質を植物に発現させる研究は世界中で行われており、特に種子については、長期に安定して保存できることから、そのような外来機能性タンパク質の生産装置として注目されており（特許文献3、非特許文献3）、同時に種子に発現させるためのプロモーターの研究もされている（非特許文献23）。

## 【0003】

イネなどの穀物種子では、種子中のタンパク質含量は数%～10%とされており、その大部分は貯蔵タンパク質という形態で存在している。貯蔵タンパク質は、発芽の際に窒素栄養源となるもので、それ以外の生理機能は有しないとされている。一般にタンパク質は、その溶解性に基づいて、グルテリン、プロラミン、グロブリン、アルブミンの4つに大別されるが、貯蔵タンパク質のタイプには植物種ごとに特徴がある。マメ科種子においてはグロブリンが主要貯蔵タンパク質であることが多い一方、穀類などの単子葉植物では、一部例外を除いてプロラミンが主要貯蔵タンパク質である（非特許文献14）。

## 【0004】

イネは、穀類の中では例外的にグルテリンが主要な貯蔵タンパク質で、種子タンパクの60～70%を占める。グルテリン遺伝子群は、ハプロイドゲノムあたり約10個の遺伝子より構成されており、これらの遺伝子群はコード領域におい



てアミノ酸レベルで60～65%の相同性を示す2つサブファミリーG1uAおよびG1uBに分類される。また、それぞれのサブファミリーにはアミノ酸レベルで80%以上の相同性を示す5個程度の遺伝子が含まれている。グルテリンは、進化的にはマメの貯蔵タンパク質グロブリンと類縁関係を持っており、アミノ酸組成は比較的必須アミノ酸に富んでいて栄養価が高い。いっぽうプロラミンは、イネ種子タンパク質の20～30%を占め、グルテリンに次ぐ含有量を持つ。特徴としては、グルタミンを多量に含み、またプロリンも比較的多く含まれる一方、必須アミノ酸であるリジンは極めて少なく、栄養価が低い。プロラミンはゲノム中に、少しずつアミノ酸配列が異なっている類似した構造の遺伝子が複数存在することが知られており、その総数は25～100の間であると推定されている。このほかの貯蔵タンパクとしては、分子量26KDaのグロブリンが数%を占めている。種子中においては、貯蔵タンパク質は、プロテインボディと呼ばれる顆粒状の細胞内構造に蓄積される。種子をタンパク質の製造工場とするなら、プロテインボディはタンパク質の倉庫の役割を果たす。イネでは、由来・外観が全く異なる2種のプロテインボディを胚乳中に共存させている点でも特徴的であり、それぞれプロテインボディ1（プロラミンが蓄積）、プロテインボディ2（グルテリンとグロブリンが蓄積）と呼ばれる（非特許文献8～10、20～22）。

#### 【0005】

貯蔵タンパク質を改変する試みは、いろいろな作物でなされており、主に栄養価の改善、加工特性の改善をめざしたものである。イネの場合は、日本酒醸造や米加工食品の原料として低タンパクであることが好まれるため、放射線照射または変異原処理したイネ変異体プールより、主要な種子貯蔵タンパク質の含量や組成が低減した変異系統の探索が精力的に行われている（非特許文献1、2、7、15～19）。これまでのところ、特定のグルテリンおよびグルテリン含有量が減少した変異イネは研究が進んでおり、これはグルテリンがイネの主要な貯蔵タンパクであり、ターゲットとして有力であることにも起因している。特にLGC-1と呼ばれる変異イネではグルテリンを減少させる変異が1遺伝子で優性遺伝することが明らかにされ、自身や他のイネと交配した後代の系統が品種登録にま

で至っている（非特許文献4、6）。また、アンチセンス遺伝子を導入した組換え低グルテリン系統も作られている（特許文献1、非特許文献5・27）。これらの系統においては、確かにグルテリンは原品種より大きく減少しているが、その反動としてプロラミンの著しい増大が見られる。これは一般に種子内のタンパク質を一定に保とうとする調節機構が働いており、グルテリンが足りないことを感知してプロラミン合成を増大させるためである。その意味では、低グルテリン系統は、貯蔵タンパク組成を改変した米であっても、低タンパク質化には十分成功していない。

#### 【0006】

いっぽう、プロラミンについては、栄養価に乏しく、消化性が悪く、米の加工特性や米飯の味を低下させるとされていることから、低下させることが望まれている。既にいくつかの変異イネが知られているものの（非特許文献1、2、15～19）、プロラミン低下の度合いが小さい、あるいは別の変異が同時に起こって稔実しなかったなどの理由から、有望系統の選抜は遅れている。このため、プロラミンが著しく増大するという、一連のグルテリン低減系統の問題点を解決する目処はたっていない。このように、低プロラミンイネの開発は今後の課題として残っている。

#### 【0007】

冒頭に述べた通り、種子を有用タンパク質の製造装置（バイオリクター）として利用する研究が注目を集めている。種子は食品として長く食べてきた歴史もあるため、有害物質の混入のリスクが小さいメリットがあり、また特別な精製操作なしに、そのまま食べられる点も大きい。このような場合に貯蔵タンパク質が減少した種子を使えば、余剰のアミノ酸が効率良く外来タンパク質合成にまわるため、発現が増大する可能性がある。貯蔵タンパク質を減少させ、その分を有用タンパク質におきかえたとしても、窒素源としての機能は果たし得るので、種子生理的にも問題はおきにくいと考えられる。また、イネの場合、グルテリンとプロラミンは厳密にわけられて別々の顆粒に集積することから、そのしくみをうまく使って、プロテインボディに集積させることでより発現量を高めたり、有用タンパク質を精製しやすくすることも考えられている。例えば、貯蔵タンパク質プ

ロラミンのシグナル配列は、同一種はもとより、イネ科種子、例えばコムギ、オムギ、トウモロコシの貯蔵タンパク質でもホモロジーが高いことから、これらの配列を用いてプロテインボディ1にタンパク質を集積させることができる可能性がある。

#### 【0008】

しかし、機能性作物の創出をめざして種子に外来タンパク質を発現させた既存の成果（特許文献4～6）においては、多くの場合は通常の品種が発現に用いられている。その場合、種子内のアミノ酸プールの大部分がイネの貯蔵タンパク質合成に消費され、有用タンパク質生産のために使える量は非常に限定されてしまう。結果として、有用タンパク質発現レベルが限定され、機能改変の効率は良くない。また、貯蔵タンパク質変異イネを外来タンパク質発現に使った例（特許文献3）においても、グルテリン低減イネは種子タンパク質総量としてはオリジナルとほぼ同等のため、やはり有用タンパク質と貯蔵タンパク質で種子内のアミノ酸プールの競合の問題は解決されていない。このように既存の技術においては、外来タンパク質の効率的な発現系を用いているとは言えない。

#### 【0009】

低タンパク質イネがあれば、何らかの形で米のタンパク質を除去して用いる場合にも、少ない労力でタンパク質を除けることから有用である。一般的な食用米や米加工食品原料としても、低タンパク質であることが好ましい（非特許文献24～26）が、近年ニーズが増している領域には、アレルゲン低減米の材料が考えられる。なんらかのアレルギーを持つ人々は日本人の約1/3にのぼるといわれ、その中で従来はあまりアレルギーが問題となっていなかった米についても、アレルギー患者が増大しつつある。このような場合、栄養的には代替食品を摂取することですむものの、食べ慣れた米が突然食べられなくなることは、精神的な苦痛がはるかに大きい。そこで、米アレルギー患者向けに、アレルゲンを低減化した加工米のニーズが高まっている。米においてアレルゲンとなっているのはグロブリンタンパク質が主であり、例えば特許文献2ではアレルゲン除去に米にタンパク質分解酵素を作用させ、グロブリンタンパク質の分解除去を試みている。また、特許文献7では、低タンパク質米を原材料にアルカリ洗浄でアレルゲン

を溶解除去する方法が述べられている。いずれもタンパク質を除去することに主眼があることから、低タンパク質米のほうがタンパク質抽出除去効率がよくなるはずであるが、実際に用いているイネ系統は通常の系統か、貯蔵タンパクの組成が変化しているが低タンパクにはなっていない系統であり、効率的ではない。また特許文献7では、既存のいろいろな変異イネを試しているだけで、戦略的に機能性作物を開発しているわけではない。さらに、その結果好ましいとされた低グルテリンまたは低プロラミンの特性は、現在の品種では両立しておらず、単独品種で広い分子量の範囲に分布するアレルゲンの包括的な除去には成功していない。

#### 【0010】

以上のことから、米および米加工品の高度利用、機能性植物・種子の作出、いずれの既存の成果においても、プロラミンを低減させることが技術開発上の隘路となっていることは明白である。

#### 【0011】

##### 【特許文献1】

特許 3149951号公報

##### 【特許文献2】

特開平 2-167040号公報

##### 【特許文献3】

特開 2002-58492号公報

##### 【特許文献4】

特開 2002-17187号公報

##### 【特許文献5】

特開平 7-213185号公報

##### 【特許文献6】

特表 2001-518305号公報

##### 【特許文献7】

特許第 3055729号公報

##### 【非特許文献1】

Iida, S. et al. (1997) Theor. Appl. Genet  
. 94, 177-183

【非特許文献2】

Iida, S. et al. (1993) Theor. Appl. Genet  
. 87, 374-378

【非特許文献3】

Molecular Breeding 9:149-158 (2002)

【非特許文献4】

農業技術55(10)、26-29(2000)

【非特許文献5】

育種学研究3:139-149(2001)

【非特許文献6】

育種学研究4:33-42(2002)

【非特許文献7】

Crop Sci. 39:825-831(1999)

【非特許文献8】

Plant Cell Physiol. 28:1517-1527(1987)

【非特許文献9】

Plant Physiol. 88:649-655(1988)

【非特許文献10】

Plant Biotechnology, 16:103-113(1999)

【非特許文献11】

Theor Appl Genet 78:305-311(1989)

【非特許文献12】

Theor Appl Genet 76:11-16(1988)

【非特許文献13】

Gamma Field Symposia, 34:31-46(1995)

## 【非特許文献 14】

J. Exp. Botany 53:947-958 (2002)

## 【非特許文献 15】

育種学研究 4 (別 1) 66 (2002)

## 【非特許文献 16】

育種学研究 47 (別 2) 632 (1997)

## 【非特許文献 17】

育種学研究 47 (別 2) 176 (1997)

## 【非特許文献 18】

育種学研究 45 (別 2) 502 (1995)

## 【非特許文献 19】

育種学研究 45 (別 1) 508 (1995)

## 【非特許文献 20】

醸協 (1993) 414-420

## 【非特許文献 21】

稻学大成第 3 巻 32-39 (1990)

## 【非特許文献 22】

稻学大成第 3 巻 317-325 (1990)

## 【非特許文献 23】

Plant Cell Physiol. 39:885-889 (1998)

## 【非特許文献 24】

「種子のバイオサイエンス」種子生理生化学研究会編 学会出版センター 2  
イネ 251-257 (1995)

## 【非特許文献 25】

「種子のバイオサイエンス」種子生理生化学研究会編 学会出版センター 4  
コメの加工製品 359-365 (1995)

## 【非特許文献 26】

「種子のバイオサイエンス」種子生理生化学研究会編 学会出版センター 5  
日本酒・清酒 366-371 (1995)

## 【非特許文献 27】

Molecular Breeding 8:273-284 (2001)

## 【0012】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、種子のタンパク質含量を減少させる方法およびそのために必要な技術の開発、そのような方法によって開発された植物およびその種子、ならびにそのような植物および種子の利用法を提供することを課題とする。

## 【0013】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ある種のプロラミンをコードする遺伝子配列の少なくとも一部に対して相補的なアンチセンス分子が、プロラミン多重遺伝子群の発現全体を顕著に減少させその結果として、種子のタンパク質含量を減少させ得ることを見出したことによって、上記課題を解決した。

## 【0014】

従って、本発明は、以下を提供する。

## 【0015】

(1) プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列に相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列または上記相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列に対して少なくとも約 70 % 相同な核酸配列を含む、核酸分子。

## 【0016】

(2) 上記プロラミンポリペプチドをコードする遺伝子配列に相補的な少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

## 【0017】

(3) 上記プロラミンは、イネのものである、項目 1 に記載の核酸分子。

## 【0018】

(4) 上記プロラミンは、ジャポニカ種のイネのものである、項目 1 に記載の核酸分子。

## 【0019】

(5) 上記相補的な少なくとも15の連続するヌクレオチド長は、少なくとも50の連続するヌクレオチド長である、項目1に記載の核酸分子。

## 【0020】

(6) 上記相補的な少なくとも15の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列は、上記プロラミンポリペプチドをコードする全長配列の相補配列を含む、項目1に記載の核酸分子。

## 【0021】

(7) 上記相補的な少なくとも15の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列は、上記プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端のものである、項目1に記載の核酸分子。

## 【0022】

(8) 上記プロラミンは、13kDaプロラミンである、項目1に記載の核酸分子。

## 【0023】

(9) (a) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43および45からなる群より選択される配列番号に示される核酸配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44および46からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ配列を有するポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44および46からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；



(d) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43 および 45 からなる群より選択される配列番号に示される核酸配列からなる DNA の対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44 および 46 からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはオルソログをコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70% である塩基配列からなり、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
に相補的な、少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長の核酸配列を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

【0024】

(10) アンチセンス活性を有する、項目 1 に記載の核酸分子。

【0025】

(11) 上記アンチセンス活性は、上記プロラミンポリペプチドの発現を減少させるものである、項目 10 に記載の核酸分子。

【0026】

(12) 項目 1 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【0027】

(13) プロモーター活性を有する配列をさらに含む、項目 12 に記載のベクター。

【0028】

(14) 上記プロモーター活性を有する配列は、貯蔵タンパク質のプロモーターである、項目 13 に記載のベクター。

## 【0029】

(15) 上記プロモーター活性を有する配列は、上記プロラミンのプロモーターである、項目12に記載のベクター。

## 【0030】

(16) ターミネーターをさらに含む、項目12に記載のベクター。

## 【0031】

(17) 選択マーカーをコードする配列をさらに含む、項目12に記載のベクター。

## 【0032】

(18) 項目1に記載の核酸分子とは異なる外来遺伝子をコードする配列をさらに含む、項目12に記載のベクター。

## 【0033】

(19) 項目1に記載の核酸分子を含む、植物細胞。

## 【0034】

(20) 項目1に記載の核酸分子とは異なる外来遺伝子をコードする核酸分子をさらに含む、項目19に記載の植物細胞。

## 【0035】

(21) 上記プロラミンが由来する植物種と、上記植物の種とは、同種のものである、項目19に記載の植物細胞。

## 【0036】

(22) 上記プロラミンが由来する植物種と、上記植物の種とは、同一品種のものである、項目19に記載の植物細胞。

## 【0037】

(23) 上記プロラミンが由来する植物種および上記植物の種は、イネである、項目19に記載の植物細胞。

## 【0038】

(24) 上記プロラミンが由来する植物種および上記植物の種は、ジャポニカ種のイネである、項目19に記載の植物細胞。

## 【0039】

(25) 2対の染色体の両方に、項目1に記載の上記核酸分子が導入された、項目19に記載の植物細胞。

【0040】

(26) 項目19に記載の植物細胞を含む、植物組織。

【0041】

(27) 項目1に記載の核酸分子を含む、植物体。

【0042】

(28) 項目1に記載の核酸分子とは異なる外来遺伝子をコードする核酸分子をさらに含む、項目27に記載の植物体。

【0043】

(29) 上記プロラミンが由来する植物種と、上記植物の種とは、同種のものである、項目27に記載の植物体。

【0044】

(30) 上記プロラミンが由来する植物種と、上記植物の種とは、同一品種のものである、項目27に記載の植物体。

【0045】

(31) 上記プロラミンが由来する植物種および上記植物の種は、イネである、項目27に記載の植物体。

【0046】

(32) 上記プロラミンが由来する植物種および上記植物の種は、ジャポニカ種のイネである、項目27に記載の植物体。

【0047】

(33) 2対の染色体の両方に、項目1に記載の上記核酸分子が導入された、項目27に記載の植物体。

【0048】

(34) 項目27に記載の植物体から生産された、種子。

【0049】

(35) 項目28に記載の植物体から生産された、種子。

【0050】

(36) 項目 27 に記載の植物体、または項目 34 に記載の種子から生産された、デンプン調製物。

【0051】

(37) 項目 28 に記載の植物体、または項目 35 に記載の種子から生産された、上記外来遺伝子の遺伝子産物を含む、組成物。

【0052】

(38) 植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させる方法であって、

A) 項目 1 に記載の核酸分子を提供する工程；

B) 上記核酸分子を上記植物の細胞に導入する工程；

C) 上記細胞を再分化させてトランスジェニック植物を作出する工程；および

D) 上記トランスジェニック植物から種子を得る工程、

を包含する、方法。

【0053】

(39) 上記導入する工程は、アグロバクテリウム法による、項目 38 に記載の方法。

【0054】

(40) さらに、

E) 上記核酸分子が導入された植物の細胞を選択する工程、

を包含する、項目 38 に記載の方法。

【0055】

(41) 上記選択する工程は、抗生物質に対する耐性を判定することによって行われる、項目 40 に記載の方法。

【0056】

(42) 植物種子中で外来遺伝子を発現させる方法であって、

A) 項目 1 に記載の核酸分子を提供する工程；

B) 上記外来遺伝子をコードする核酸分子を提供する工程；

C) 上記項目 1 に記載の核酸分子および上記外来遺伝子をコードする核酸分子を上記植物の細胞に導入する工程；

D) 上記細胞を再分化させてトランスジェニック植物を作出する工程；ならびに

E) 上記トランスジェニック植物から種子を得る工程、  
を包含する、方法。

【0057】

(43) 上記導入する工程は、アグロバクテリウム法による、項目42に記載の方法。

【0058】

(44) さらに、

F) 上記核酸分子が導入された植物の細胞を選択する工程、  
を包含する、項目42に記載の方法。

【0059】

(45) 上記選択する工程は、抗生物質に対する耐性を判定することによって行われる、項目44に記載の方法。

【0060】

(46) さらに

G) 上記種子から上記外来遺伝子の遺伝子産物を分離する工程、  
を包含する、項目42に記載の方法。

【0061】

(47) 項目42に記載の方法によって生産された、上記外来遺伝子の遺伝子産物を含む、組成物。

【0062】

(48) 植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させるための、項目1に記載の核酸分子の使用。

【0063】

(49) 植物の種子中で外来遺伝子を発現させるための、項目1に記載の核酸分子の使用。

【0064】

(50) 上記種子中における上記植物の天然のタンパク質発現が低減してい

る、項目 49 に記載の使用。

#### 【0065】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

#### 【0066】

##### (用語)

本明細書において「種子タンパク質」は、作物の種子に蓄積するタンパク質をさす。溶媒に対する溶解性の違いで呼び分けることが多く、水溶性のアルブミン、塩水溶液可溶性のグロブリン、含水アルコールに可溶のプロラミン、希酸または希アルカリに可溶なグルテリンに大別される。

#### 【0067】

本明細書において「プロラミン」は 50～90% 程度の含水アルコールに可溶であるタンパク質の総称であり、穀類種子は、このプロラミンタイプのタンパク質が主要な貯蔵タンパク質であることに特徴がある。穀類ごとに独特の呼び名があり、代表的なものとしては、コムギグルテニン、オオムギホルディン、トウモロコシゼイン、オートムギアベニンなどがあげられるが、イネの場合は単にプロラミンと呼ばれる。ただしイネの場合は、グルテリンが種子タンパク質の 60～70% をしめる主要タンパク質で、プロラミンはそれに次いで含有量が 20～30%、グロブリンが数%とされている。プロラミンの分子量は植物種ごとに異なっていることが多いが、共通する特徴としては、それらのアミノ酸配列がグルタミンに富み、それが連続する（例えば Gln-Gln、Gln-Gln-Gln など）領域または一定アミノ酸ごとに出現する（例えば Gln-Xaa-Gln-Xaa-Gln）領域があることがあげられる。また、グルタミン以外にプロリンおよびシステインなどを含めた数アミノ酸以上よりなるモチーフ（例えば Glu-Phe-Val-Arg-Gln-Gln-Cys-Ser-Pro（配列番号 85）、あるいは Cys-Gln-Val-Met-Gln-Gln-Gln-Cys-Cys-Gln-Gln（配列番号 86）およびその 1 または

数個の置換、付加もしくは欠失を含む配列) が、プロラミン遺伝子のアミノ酸配列に共通的に保存されていることも特徴である。S S結合に関与するC y s残基の位置もよく保存されている。さらに、これらのモチーフは同一植物内のプロラミン遺伝子に限らず、異なる植物種間でも保存されている場合が多いことから、進化的には共通祖先を持つプロラミン遺伝子スーパーファミリーを形成するとされている (Shewry, P E et al., Plant Cell 7, 945-956, 1995)。他の貯蔵タンパク質の場合と同様に、プロラミン遺伝子はゲノム中に多コピー存在し、多重遺伝子族 (マルチジーン) であることが知られている。それぞれの遺伝子から作られた、アミノ酸配列が少しずつ異なるタンパク質が混合して種子に存在している。

#### 【0068】

イネプロラミンは、55～60%の1-プロパノールにより効率良く抽出される (Sugimoto, T. et al., Agric. Biol. Chem. 50, 2409-2410, 1986)。また、ゲノミックサザン分析、cDNAクローニングや等電点電気泳動により、遺伝子の数は25～100と推定されている。これらはいくつかのサブファミリーに分類することができ、研究者によって、また実験に使われた品種によって分類方法とタンパクの呼称は様々にあるが、もっとも一般的な分類としては、1次元のSDS電気泳動における分子量によるものがあげられる。その場合は、10KDa、13KDa (インディカ種では14KDaと記述される場合があり、本明細書において13KDaプロラミンというときはこの14KDaも含む)、16KDa (インディカ種では18KDaと記述される場合がある。本明細書において16KDaプロラミンというときはこの18KDaも含む) などのものが存在する。それぞれのプロラミンのバンドは、1次元のSDS電気泳動では1本であっても、その中には多数の種類のタンパク質が混合しており、10KDaについては1種以上、16KDaについては3種以上、もっとも多重度の高い13KDaについては確認されただけで12種類、実際はそれ以上あることがわかっている。13KDaプロラミンについて、タンパク質スポットとcDNAの対応関係から詳細に分類した研究 (Mitsukawa, N et al., Plant Biotech. 16, 103

ー113, 1999)では、SS結合を還元するかしないかで溶解性が変化する性質、アミノ酸配列の相同性とシステイン残基の数によりタイプを4つに分類した例がある。このほか、コムギの分類例にならって、イオウ含有量（主にシステイン残基の含有量）によりsulphur-richタイプ、sulphur-poorタイプという分類の例もあり、sulphur-poorタイプにはシステインが含まれていない。プロラミンはいずれもタンパク質のN末端がブロックされているため、プロテインシーケンスによる解析が困難であることから、タンパク質・cDNAいずれのレベルでも未同定であるプロラミンや、cDNAとの対応関係が不明確であるプロラミンが、依然として多数存在すると考えられる。しかし、どのような分類法・呼称をとるとしても、そのタンパク質がプロラミンに属するものかどうかは、1) 含水アルコールに溶解する、2) グルタミンに富むアミノ酸配列（少なくとも10%以上）または、リジンが極めて少ない（3%以下）か、1つもない、3) 1～数アミノ酸ごとにグルタミン残基が出現する、またはグルタミンが2個以上連続して出現する場所が複数存在する4) グルタミンを核として、プロリン、システインなどのアミノ酸を含む配列モチーフ（Glu-Phe-Val-Arg-Gln-Gln-Cys-Ser-Pro（配列番号85）、あるいはCys-Gln-Val-Met-Gln-Gln-Gln-Cys-Cys-Gln-Gln（配列番号86）またはそれと50%以上の相同性を有するモチーフ）が、保存されているといった共通事項があり、当業者には容易に判別し得る。4) について例をあげるなら、Gln-Gln-Cys-Cys-Gln-Gln（配列番号87）というモチーフは、イネプロラミンにもコムギグルテニンにも高度に保存されているし、またGlu-Phe-Val-Arg-Gln-Gln（配列番号88）はイネプロラミンとトウモロコシグリアジン、オートムギアベニンなどに保存されている。このように、分子量の違いやタンパク質全体の相同性が低い場合があっても、穀物プロラミンは祖先遺伝子を同じくするプロラミン遺伝子スーパーファミリーとして認識されている（Shewry, P E et al., Plant Cell 7, 945-956, 1995）。イネプロラミンこれまでに論文として報告されたものでは、cDNAレベルではλRM1、λRM2、λRM4、λRM7、λRM9、1p



S18、pS23、pX24、pProl7、pProl14、pProl17、 $\lambda$ RP16、 $\lambda$ RP10といったものがあるが、それに限定されない。そのようなプロラミンとしては、例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29（13kDプロラミン）、31（16kDプロラミン）、33、35、37、39、41、43および45（10kDプロラミン）からなる群より選択される配列番号に示される核酸配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド、ならびに配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30（13kDプロラミン）、32（16kDプロラミン）、34、36、38、40、42、44および46（10kDプロラミン）からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ配列を有するポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドが挙げられるがそれに限定されない。そのようなプロラミンの遺伝子は、Genbank、DDBJなどのような遺伝子バンクにおいて登録されているプロラミン遺伝子であれば、上記以外のものでも使用することができる。

#### 【0069】

本明細書において「13KDaプロラミン」は、一般にジャポニカイネにおいてSDS電気泳動法において分子量が13KDa付近にくるプロラミンを示し、イネに最も多く含まれるプロラミンである。その遺伝子もゲノムにもっとも多数存在し、cDNAクローニングや等電点電気泳動などで解析された結果、少しずつアミノ酸配列の異なる遺伝子が最低でも12以上あることが確認されており、実際はさらに数が多いと推定されている。代表的なものとして配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27または29に示される核酸配列および配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28または30に示されるアミノ酸配列を含むプロラミン、ならびにそれに対応した他植物のプロラミン遺伝子スーパーファミリーのものもあげられるが、それに限定されない。

#### 【0070】

本明細書において「貯蔵タンパク質」とは、植物の種子において特に高度に蓄

積し、酵素活性など植物内で他の生理機能を有さないタンパク質をいい、通常はプロテインボディに集積される。

#### 【0071】

本明細書において「プロテインボディ」は、貯蔵タンパク質を集積する顆粒状の細胞内構造をいう。通常は1つの植物に1種類存在することが多いが、イネとオートムギでは、外観、形態が明確に異なる2種類のプロテインボディが形成される。イネの場合は、プロラミンが蓄積するプロテインボディタイプ1と、グルテリンおよびグロブリンが蓄積するプロテインボディタイプ2がある。両者は外観、形態、サイズ、由来などがはっきりと異なっており、プロテインボディと貯蔵タンパク質の対応関係は厳密に制御されている。

#### 【0072】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされ得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。

#### 【0073】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌ

クレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5' ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA 中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体 (例えば、縮重コドン置換体) および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1 またはそれ以上の選択された (または、すべての) コドンの3 番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzeraら、Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

#### 【0074】

用語「核酸分子」はまた、本明細書において、核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用され、cDNA、mRNA、ゲノムDNAなどを含む。本明細書では、核酸および核酸分子は、用語「遺伝子」の概念に

含まれ得る。ある遺伝子配列をコードする核酸分子はまた、「スプライス変異体（改変体）」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を包含する。その名が示唆するように「スプライス変異体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み過し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。

#### 【0075】

本明細書において「単離された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

#### 【0076】

本明細書において「精製された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。

#### 【0077】

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定する構造遺伝

子といい、その発現を左右する調節遺伝子という。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」をさすことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」とは、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」をさす。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

#### 【0078】

本明細書において遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられる。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。

#### 【0079】

本明細書では塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

#### 【0080】

本明細書において「外来遺伝子」とは、ある植物において、その植物には天然には存在しない遺伝子をいう。そのような外来遺伝子は、その植物に天然に存在

する遺伝子を改変したものであってもよく、天然において他の植物に存在する遺伝子であってもよく、人工的に合成した遺伝子であってもよく、それらの複合体（例えば、融合体）であってもよい。そのような外来遺伝子を含む植物は、天然では発現しない遺伝子産物を発現し得る。

#### 【0081】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Gait, M. J. (1990). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F. (1991). *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

#### 【0082】

本明細書において「外来遺伝子」は、植物において発現し得るものであれば、どのようなものでもよい。従って、1つの実施形態において「外来遺伝子」は、大量に発現されることが企図される有用なタンパク質をコードするものであれば、どのようなものでもよく、そのようなものもまた、本発明の範囲内に含まれる。そのような外来遺伝子としては、例えば、医薬活性のあるペプチド（例えば、サイトカイン類（インターロイキン類、ケモカイン類、顆粒球マクロファージコ

ロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、multi-CSF (IL-3)、エリスロポエチン (EPO)、白血病抑制因子 (LIF)、c-kitリガンド (SCF) のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類、血小板由来増殖因子 (PDGF)、上皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝実質細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) など)、ホルモン類 (インスリン、成長ホルモン、甲状腺ホルモンなど)、ワクチン抗原、血液製剤、農業生産上有用なペプチド、例えば抗菌タンパク質、生理作用・薬理作用を持つ2次代謝産物を合成する様々な酵素や加水分解酵素、酵素反応を調節するインヒビター、血圧効果作用を持つとされるダイズグリシニン、あるいは消化管内で酵素分解を受けることで生理活性ペプチドが切り出されるようにデザインされた人工タンパク質といったものがあげられるがそれらに限定されない。また栄養学的に意義のある物質としては、カゼイン、マメ類のアルブミンやグロブリン、あるいはビタミン類・糖・脂質の合成酵素などがあげられるがそれらに限定されない。さらに様々な加工食品の原料として加工特性に関与するタンパク質として、例えばコムギグルテニン (製パン)、ダイズグロブリン群 (豆腐)、ミルクカゼイン群 (チーズ) など、また食品の嗜好性や機能性を強化するタンパク質、例えばシクロデキストリンやオリゴ糖、 $\gamma$ アミノ酢酸などの特殊な糖・アミノ酸類の合成酵素群、外観を良くする色素合成酵素や味覚成分合成に関与するタンパク質群、あるいは、消化管内で酵素消化を受けることにより、生理作用をもつペプチド (例えば血圧効果作用をもつ、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドなど) が切り出されるようにデザインされた人工タンパク質などがあげられるがこれらに限定されない。

### 【0083】

発現されるべき外来遺伝子はまた、上述の天然型の外来遺伝子と相同性のあるものが使用され得る。そのような相同性を有する外来遺伝子としては、例えば、Blastのデフォルトパラメータを用いて比較した場合に、比較対照の外来遺伝子に対して、少なくとも約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、

約 90%、約 95%、約 99% の同一性または類似性を有する核酸配列を含む核酸分子または少なくとも約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド分子が挙げられるが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0084】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されて mRNA が作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

#### 【0085】

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチドの発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「増加」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチドの発現量の増加を含む。

#### 【0086】

本明細書において、「アミノ酸」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸の L-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタ



ミン、γ-カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および/または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

#### 【0087】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。

#### 【0088】

本明細書において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

#### 【0089】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予想される、別の種における遺伝子をいい、しばしば特定のアミノ酸配列が高度に保存

されている領域が共通して見られる。このような特徴は、それらが進化的には同一祖先を有するものであり、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。対応する遺伝子は、同族遺伝子を包含する。例えば、イネプロラミンに対応するコムギ遺伝子は、コムギグルテニンであり得る。

#### 【0090】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-Ο-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0091】

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド(長さが $n$ )に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個(または例えば上下10%)のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では

、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。

#### 【0092】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子がアンチセンス分子である場合、その生物学的活性は、対象となる核酸分子への結合、それによる発現抑制などを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

#### 【0093】

本明細書において「アンチセンス活性」とは、標的となる遺伝子の発現を特異的に抑制または減少させることができる活性をいう。より具体的には細胞内に導入したあるヌクレオチド配列に依存して、その配列と相補的なヌクレオチド配列領域をもつ遺伝子のmRNA量を特異的に低下させることで、タンパク発現量を減少させ得る活性をいう。手法としては、標的となる遺伝子からつくられるmRNAに相補的なRNA分子を直接的に細胞に導入する方法と、細胞内に目的遺伝子と相補的なRNAを発現させ得る構築ベクターを導入する方法に大別されるが、植物においては、後者のほうが一般的である。

#### 【0094】

アンチセンス活性は、通常、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列によって達成される。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオ

チド長の、核酸配列であり得る。そのような核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。そのようなアンチセンス活性は、目的とする遺伝子の核酸配列の5'末端の配列に対して相補的であることが好ましい。そのようなアンチセンスの核酸配列には、上述の配列に対して、1つまたは数個あるいは1つ以上のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を有するものもまた含まれる。したがって、本明細書において、「アンチセンス活性」には、遺伝子の発現量の減少が含まれるがそれらに限定されない。

#### 【0095】

一般的なアンチセンス技術については、教科書に記載されている (Murray, J A H eds., Antisense RNA and DNA, Wiley-Liss Inc, 1992)。さらに最新の研究でRNA interference (RNAi) と呼ばれる現象が明らかになり、アンチセンス技術の発展をもたらした。RNAiは、標的遺伝子に相同な配列をもつ短い長さの2本鎖RNA (20ベース程度) を細胞内に導入すると、そのRNA配列に相同な標的遺伝子のmRNAが特異的に分解されて発現レベルが低下する現象である。当初線虫において発見されたこの現象は、植物を含めて生物に普遍的な現象であることがわかってきて、アンチセンス技術で標的遺伝子の発現が抑制される分子レベルのメカニズムは、このRNAiと同様のプロセスを経ることが解明された。従来は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的である1つのDNA配列を適当なプロモーターに連結して、その制御下に人工mRNAを発現させるような発現ベクターを構築して、細胞内に導入することが行われた。最近の知見においては、細胞内に2本鎖RNAを構成できるようにデザインされた発現ベクターが用いられる。基本構造はある標的遺伝子に相補的な1種のDNA配列をプロモーター下に1つを連結し、それと同じ物をさらに逆向きにもう1つ連結してつくられる。この構築遺伝子から転写された1本鎖のmRNAでは、逆向きにつながれた1種類のヌクレオチド配列部分が相補的な関係にあるため対合してヘアピン様の2次構造を持つ2本鎖RNA状態をとり、これがRNAiのメカニズムに従って

標的遺伝子の mRNA 分解を引き起こすわけである。植物においてはシロイヌナズナで用いられた例が報告されている (Smith, N A et al., Nature 407, 319-320, 2000)。また RNA i 全般については、最近の総説にまとめられている (森田と吉田、蛋白質・核酸・酵素 47, 1939-1945, 2002)。これらの文献に記載された内容は、本明細書においてその全体を参考として援用する。

本明細書において「RNA i」とは、RNA interference の略称で、二本鎖 RNA (dsRNA とともいう) のような RNA i を引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同な mRNA が特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書において RNA i はまた、場合によっては、RNA i を引き起こす因子と同義に用いられ得る。

#### 【0096】

本明細書において「RNA i を引き起こす因子」とは、RNA i を引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「RNA i を引き起こす因子」とは、その遺伝子に関する RNA i を引き起こし、RNA i がもたらす効果 (例えば、その遺伝子の発現抑制など) が達成されることをいう。そのような RNA i を引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約 70% の相同性を有する配列またはストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも 10 ヌクレオチド長の二本鎖部分を含む RNA またはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3' 突出末端を含み、より好ましくは、3' 突出末端は、2 ヌクレオチド長以上の DNA (例えば、2~4 ヌクレオチド長の DNA) であり得る。

#### 【0097】

本明細書において、外来遺伝子のポリペプチドを生産する方法としては、例えば、遺伝子操作手法を利用して、そのポリペプチドをコードする遺伝子を適切な発現ベクターに組み込み、これを用いて発現宿主を形質転換し、この形質転換細胞の培養上清から組換えポリペプチドを得ることができる。上記宿主細胞は、外

来遺伝子の少なくとも 1 つの生理活性を保持するポリペプチドを発現するものであれば、特に限定されず、従来から遺伝子操作において利用される各種の宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、動物細胞など）を用いることが可能である。このようにして得られた細胞に由来するポリペプチドは、天然型のポリペプチドと実質的に同一の作用を有する限り、アミノ酸配列中の 1 以上のアミノ酸が置換、付加および／または欠失していてもよく、糖鎖が置換、付加および／または欠失していてもよい。

#### 【0098】

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはその DNA コード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応する DNA において行われ得る。

#### 【0099】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている (K y t e, J および D o o l i t t l e, R. F. J. M o l. B i o l. 157 (1): 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など）との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン／シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (

ー 1. 6) ; ヒスチジン (ー 3. 2) ; グルタミン酸 (ー 3. 5) ; グルタミン (ー 3. 5) ; アスパラギン酸 (ー 3. 5) ; アスパラギン (ー 3. 5) ; リジン (ー 3. 9) ; およびアルギニン (ー 4. 5) ) である。

#### 【0100】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸 (+3.0±1) ; グルタミン酸 (+3.0±1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (+0.2) ; グリシン (0) ; スレオニン (ー0.4) ; プロリン (ー0.5±1) ; アラニン (ー0.5) ; ヒスチジン (ー0.5) ; システイン (ー1.0) ; メチオニン (ー1.3) ; バリン (ー1.5) ; ロイシン (ー1.8) ; イソロイシン (ー1.8) ; チロシン (ー2.3) ; フェニルアラニン (ー2.5) ; およびトリプトファン (ー3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

#### 【0101】

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、±2以内のもの同士、好ましくは±1以内のもの同士、より好ましくは±0.5以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従

って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0102】

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ (homolog)」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ (ortholog)」とは、オルソログ遺伝子 (orthologous gene) ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスの  $\alpha$  ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの  $\alpha$  ヘモグロビン遺伝子および  $\beta$  ヘモグロビン遺伝子はパラログ（遺伝子重複で生じた遺伝子）である。また、システインプロテアーゼインヒビターである、ヒトのシスタチンAと、イネのオリザシスタチンとを比較すると、標的となるプロテアーゼとの相互作用に重要と考えられる3箇所の短いアミノ酸モチーフが保存されているだけで、他の部分のアミノ酸の共通性は非常に低い。しかし、両者はともにシスタチン遺伝子スーパーファミリーに属し、共通祖先遺伝子を持つとされていることから、単に全体的なアミノ酸の相同性に限らず



、局所的に高い相同性を持つアミノ酸配列が共通して存在する場合も、オルソログたり得る。このように、オルソログは、通常別の種においてもとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

### 【0103】

「保存的（に改変された）改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の 1 つの種である「サイレント改変（変異）」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン（通常メチオニンのための唯一のコドンである A U G、および通常トリプトファンのための唯一のコドンである T G G を除く）が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、DNA ポリメラーゼ、K l e n o w フラグメント、DNA リガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法（特定部位指向突然変異法；M a r k Z o l l e r a n d M i c h a e l S m i t h, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y, 100, 468-500 (1983)）が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うことも

できる。

#### 【0104】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

#### 【0105】

本明細書において使用される用語「ペプチドアナログ」または「ペプチド誘導体」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のアミノ酸アナログまたはアミノ酸誘導体が付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能（例えば、 $pK_a$ 値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど）と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、ペプチドアナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。

#### 【0106】

同様に、「ポリヌクレオチドアナログ」、「核酸アナログ」は、ポリヌクレオ

チドまたは核酸とは異なる化合物であるが、ポリヌクレオチドまたは核酸と少なくとも 1 つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ポリヌクレオチドアナログまたは核酸アナログには、もとのペプチドに対して、1 つ以上のヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体が付加または置換されているものが含まれる。

#### 【0107】

本明細書において使用される核酸分子は、発現されるポリペプチドが天然型のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていてもよい。あるいは、5' 末端および／または 3' 末端に他の核酸が結合していてもよい。また、ポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような遺伝子は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

#### 【0108】

このような核酸は、周知の PCR 法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

#### 【0109】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1 つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1 または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの 20 % 以内、

10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

#### 【0110】

本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、植物の特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位（特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。

#### 【0111】

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるものをいう。そのようなベクターとしては、原核生物細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体等の宿主細胞において自律複製が可能であるか、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。本明細書においてベクターは、発現ベクター、組換えベクターなどであり得る。

#### 【0112】

本明細書においてベクターとしては、遺伝子実験に用いられる一般的なバクテリア（代表的なものとして大腸菌 K12 株由来の大腸菌株）で複製可能かつ単離精製可能な物があげられる。これは植物に導入する目的遺伝子を構築するために必要である。具体的には、例えば大腸菌の pBR322 プラスミドや pUC18、pUC19、pBluescript、pGEM-T といった市販構築プラスミドがある。エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法といった直接的に遺伝子断片を植物細胞に導入して形質転換する場合には、このような市販されている一般的なプラスミドを用いて導入する遺伝子の構築を行えばよい。また、ベクターの特殊な例として、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入法を用いて植物細胞を形質転換する場合は、大腸菌とアグロバクテリウム双方の複製開始点、および植物に導入され得る境界領域を示す T-DNA 由来の境界配列（Left border および Right Border）に相当するヌクレオチド配列を有する「バイナリーベクター」と呼ばれるプラ

スミドを用いる必要がある。例えば pBI101 (Clontech 社より市販)、pBIN (Bevan, N., Nucleic Acid Research 12, 8711-8721, 1984)、pBINPlus (van Engelen, FA et al., Transgenic Research 4, 288-290, 1995)、pTN または pTH (Fukuoka H et. al., Plant Cell Reports 19, 2000)、pPZP (Hajdukiewicz P et al., Plant Molecular Biology 25, 989-994, 1994) などがあげられるがそれらに限定されない。このほか、植物に利用され得るベクターとしては、タバコモザイクウイルスベクターも例示されるが、このタイプのベクターは目的遺伝子を植物染色体に導入するわけではないので、遺伝子導入した植物を種子を介して増殖させること必要がない場合に用途が限定されるが、本発明に使用し得る。

#### 【0113】

「発現カセット」は、ある構造遺伝子、およびその発現を調節するプロモーター配列や種々の調節エレメント、および mRNA 転写を終結させるターミネーター配列を、宿主の細胞中で構造遺伝子が動作し得る状態で連結してある人工構築遺伝子の 1 単位を示す。代表的なものとしては、遺伝子導入された宿主細胞のみを選択するための選択マーカー（例えばハイグロマイシン耐性遺伝子）発現カセット、あるいは宿主細胞内に発現させたい有用蛋白質遺伝子の発現カセットといったものが例示される。準備すべき発現カセットの種類・構造と数については、生物・宿主細胞・目的に応じて使い分けられるべきであり、その組み合わせは当業者には周知である。

#### 【0114】

「発現ベクター」は、上記の「発現カセット」を 1 つ以上含み得る「ベクター」として定義される。植物に導入を行うべき目的遺伝子発現カセットごとに別々のベクター上に配置しても良いし、1 つのベクター上に全ての発現カセットを連結しても良い。本発明に用いる植物用の発現ベクターは、バイナリーベクタータイプであり得る。さらにはこのベクターには導入する目的遺伝子発現カセットと

い同時に、宿主植物に適した選択マーカー（例えばハイグロマイシン耐性遺伝子）発現カセットを含み得る。

#### 【0115】

本明細書において使用される選択マーカーとしては、例えばハイグロマイシンホストランスフェラーゼ、変異型アセト酪酸シンターゼなどがあげられるがそれらに限定されない。選択マーカー発現カセットに利用し得るプロモーターとしては、CaMV35Sプロモーターおよびその改変プロモーター、ユビキチンプロモーターなど、ターミネーターとしてはNosターミネーター、Tmlターミネーター、10KDaプロラミンターミネーターがあげられるがそれらに限定されない。

#### 【0116】

「ターミネーター」とは、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に参与する配列である。ターミネーターとしては、CaMV35Sターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター（Tnos）、タバコPR1a遺伝子のターミネーターが挙げられるが、これに限定されない。本発明では、植物においてターミネーターの活性を示すものであれば、どのような配列でも使用することができる。

#### 【0117】

本明細書において用いられる「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2kbp以内に存在する。好ましくは、本発明では、特異的に発現させるプロモーターが使用され得る。

そのような特異的プロモーターとしては、貯蔵タンパク質における特異的な発現を駆動するプロモーターが好ましいがそれに限定されない。より好ましくは、本発明では、プロモーターは、貯蔵タンパク質（例えば、プロラミン）に由来するものが使用され得るが、それに限定されない。1つの好ましい実施形態では、プロラミン 13 kDa に由来するプロモーター、プロラミン 10 kDa に由来するプロモーターが使用され得る。

#### 【0118】

本明細書において、遺伝子の発現について用いられる場合、一般に、「部位特異性」とは、生物（例えば、植物）の部位（例えば、植物の場合、プロテインボディ、根、茎、幹、葉、花、種子、胚乳、胚芽、胚、果実など）におけるその遺伝子の発現の特異性をいう。「時期特異性」とは、生物（たとえば、植物）の発達段階（例えば、植物であれば生長段階（例えば、プロテインボディの形成の特定の時期、発芽後の芽生えの日数））に応じたその遺伝子の発現の特異性をいう。そのような特異性は、適切なプロモーターを選択することによって、所望の生物に導入することができる。

#### 【0119】

本明細書において、本発明のプロモーターの発現が「構成的」であるとは、生物のすべての組織において、その生物の生長の幼若期または成熟期のいずれにあってもほぼ一定の量で発現される性質をいう。具体的には、本明細書の実施例と同様の条件でノーザンブロット分析したとき、例えば、任意の時点で（例えば、2点以上（例えば、5日目および15日目））の同一または対応する部位のいずれにおいても発現がみられるとき、本発明の定義上、発現が構成的であるという。構成的プロモーターは、通常の生育環境にある生物の恒常性維持に役割を果たしていると考えられる。本発明のプロモーターの発現が「ストレス（または刺激）応答性」であるとは、少なくとも1つのストレス（または刺激）が生物体に与えられたとき、その発現量が変化する性質をいう。特に、発現量が増加する性質を「ストレス（または刺激）誘導性」といい、発現量が減少する性質を「ストレス（または刺激）減少性」という。「ストレス（または刺激）減少性」の発現は、正常時において、発現が見られることを前提としているので、「構成的」な発

現と重複する概念である。これらの性質は、生物の任意の部分から RNA を抽出してノーザンブロット分析で発現量を分析することまたは発現されたタンパク質をウェスタンブロットにより定量することにより決定することができる。ストレス（または刺激）誘導性のプロモーターを本発明のポリペプチドをコードする核酸とともに組み込んだベクターで形質転換された植物または植物の部分（特定の細胞、組織など）は、そのプロモーターの誘導活性をもつ刺激因子を用いることにより、ある条件下でのみ貯蔵タンパク質の低減およびそれに伴う目的のタンパク質の発現を行うことができる。

#### 【0120】

「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。植物において使用する場合、エンハンサーとしては、例えば、CaMV 35S プロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好ましい。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

#### 【0121】

本明細書において「作動可能に連結された（る）」とは、所望の配列の発現（作動）がある転写翻訳調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

#### 【0122】

本発明を植物において利用する場合、植物細胞への植物発現ベクターの導入には、当業者に周知の方法、例えば、アグロバクテリウムを介する方法および直接細胞に導入する方法、が用いられ得る。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、Nagelらの方法（Nagelら（1990）、Microbiol. Lett., 67, 325）が用いられ得る。この方法は、まず、例えば植物に適切な発現ベクターでエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムを形質転換し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムをGelvinら（Gelvinら編（1994）、Plant Molecular Biology Manual（Kluwer Academic Press Pub



lishers))に記載の方法で植物細胞に導入する方法である。植物発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法(Shimamotoら(1989)、Nature、338:274-276;およびRhodesら(1989)、Science、240:204-207を参照のこと)、パーティクルガン法(Christouら(1991)、Bio/Technology 9:957-962を参照のこと)ならびにポリエチレングリコール(PEG)法(Dattaら(1990)、Bio/Technology 8:736-740を参照のこと)が挙げられる。これらの方法は、当該分野において周知であり、形質転換する植物に適した方法が、当業者により適宜選択され得る。

#### 【0123】

植物発現ベクターを導入された細胞は、まずハイグロマイシン耐性、カナマイシン耐性などの薬剤耐性で選択される。次いで、当該分野で周知の方法により、植物組織、植物器官および/または植物体に再分化され得る。さらに、植物体から種子が取得され得る。導入した遺伝子の発現は、ノーザンブロット法またはPCR法により、検出し得る。必要に応じて、遺伝子産物たるタンパク質の発現を、例えば、ウェスタンブロット法により確認し得る。

#### 【0124】

本発明は、植物において特に有用であることが示されているが、他の生物においても利用することができる。本発明において使用される分子生物学技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook Jら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。

#### 【0125】

「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞等が例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれ、本明細書においてそれらの形態をすべて包含するが、特定の文脈において特定の形態を指し得る。

#### 【0126】

形質転換を行う方法において、物理的手法には、ポリエチレングリコール法（PEG法）、電子穿孔（エレクトロポレーション）法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法がある。これらの方法は、単子葉、双子葉の両植物体に適用できる点で有用性が高い。しかし、ポリエチレングリコール法とエレクトロポレーション法では、細胞壁が障害となるため、プロトプラストを用いなければならない上、導入された遺伝子の植物細胞の染色体DNAへの組込み頻度が低いことが問題である。また、プロトプラストを用いずに、カルスや組織を用いたマイクロインジェクション法では、針の太さや組織の固定等に関して困難が多い。組織を用いたパーティクルガン法でも、変異がキメラの形で出現してくる等の問題がある。また、これら物理的手法では、一般に、導入された外来遺伝子が核ゲノムに不完全な状態で多コピーの遺伝子として組込まれやすい。外来遺伝子が多コピー導入されると、その遺伝子が不活化されやすいことが知られている。

#### 【0127】

他方、生物を利用して単離遺伝子を導入する方法には、アグロバクテリウム法、ウイルスベクター法、および近年開発されている、花粉をベクターとして用いる方法がある。これらの方法は、プロトプラストを用いず植物のカルス、組織または植物体を用いて遺伝子導入を行うため、培養が長期間に及ぶことがなく、またソマクローナル変異等の障害を受けにくいという長所を有している。これらのうち花粉をベクターとして用いる方法は、まだ実験例も少なく、植物の形質転換法としては未知数の部分が多い。ウイルスベクター法は、ウイルスに感染した植物体全体に導入すべき遺伝子が広がるという利点はあるものの、各細胞内で増幅されて発現されるだけで、次世代に伝えられるという保証がないという点、および長いDNA断片を導入できないという点に問題がある。アグロバクテリウム法

は、約 20 k b p 以上の DNA を大きな再編成なしに染色体に導入できること、導入される遺伝子のコピー数が、数コピーと少ないこと、および再現性が高いこと等、多くの利点がある。イネ科植物等の単子葉植物にとってアグロバクテリウムは宿主範囲外であるため、イネ科植物への外来遺伝子導入は、従来は、先に述べたような物理的手法により行われてきた。しかしながら、近年、単子葉植物でもイネ等、培養系が確立されている植物においては、アグロバクテリウム法が適用されるようになっており、むしろ現在ではアグロバクテリウム法が好んで用いられている。

#### 【0128】

アグロバクテリウム法による外来遺伝子の導入では、T i プラスミド V i r 領域に植物が合成するアセトシリニンゴン等の低分子フェノール化合物が作用すると、T i プラスミドから T-DNA 領域が切り出され、幾つかの過程を経て植物細胞の核染色体 DNA に組み込まれる。双子葉植物では、植物自身がそのようなフェノール化合物の合成機構を備えているため、リーフディスク法等により容易に外来遺伝子を導入することができ、再現性も高い。これに対し、単子葉植物では、そのようなフェノール化合物を植物自身が合成しないため、アグロバクテリウムによる形質転換植物の作出は困難であった。しかし、アグロバクテリウムの感染時にアセトシリニンゴンを添加することで、単子葉植物への外来遺伝子導入も現在では可能となっている。

#### 【0129】

本発明において、形質転換体では、目的とする核酸分子（導入遺伝子）は、染色体に導入されていても導入されていなくてもよい。好ましくは、目的とする核酸分子（導入遺伝子）は、染色体に導入されており、より好ましくは、2つの染色体の両方に導入されている。

#### 【0130】

植物細胞としては、本明細書において以下に記載されるものが挙げられ、イネ、ポテト、タバコ、トウモロコシ、アブラナ、大豆、トマト、ニンジン、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻のほか、木本植物（例えば、ポプラ）の細胞などを挙げることができる。より好ましくは、植物細胞は、イネであり得る。

イネとしては、ジャポニカ種、インディカ種のものが挙げられるがそれらに限定されない。より好ましくは、イネは、ジャポニカ種のものであり得る。本明細書において、イネの品種としては、例えば日本晴、ニホンマサリ、金南風、農林22号、中生旭、コシヒカリ、あきたこまち、どんとこい、ヒノヒカリ、マンゲツモチ、カグラモチ、ハクチョウモチ、LGC-1、春陽などが挙げられるがそれらに限定されない。インディカ種の品種としては、T e t e p、B a s m a t i、I R 8、湖南早などが挙げられるがそれらに限定されない。植物細胞への組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であれば、本明細書において他の場所で詳述したように、いずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (A g r o b a c t e r i u m) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等が例示される。

#### 【0131】

本明細書において用いられる「植物」とは、植物界に属する生物の総称であり、クロロフィル、かたい細胞壁、豊富な永続性の胚的組織の存在、および運動する能力がない生物により特徴付けられる。代表的には、植物は、細胞壁の形成・クロロフィルによる同化作用をもつ顕花植物をいう。「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。好ましい植物としては、例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ、オオムギ、ソルガムなどのイネ科に属する単子葉植物が挙げられる。より好ましくは、植物は、イネであり得る。イネとしては、ジャポニカ種、インディカ種のものが挙げられるがそれらに限定されない。より好ましくは、イネは、ジャポニカ種のものであり得る。本明細書において、イネの品種としては、例えば日本晴、ニホンマサリ、金南風、農林22号、中生旭、コシヒカリ、あきたこまち、どんとこい、ヒノヒカリ、マンゲツモチ、カグラモチ、ハクチョウモチ、LGC-1、春陽などが挙げられるがそれらに限定されない。インディカ種の品種としては、T e t e p、B a s m a t i、I R 8、湖南早などが挙げられるがそれらに限定されない。もっとも好ましくは、例えばLGC-1のような他の貯蔵タンパク質 (例えば、グルテリン、グロブリンなど) の発現が低減さ

れるように改変されたイネが本発明において使用される。好ましい植物は作物に限られず、花、樹木、芝生、雑草なども含まれる。特に他で示さない限り、植物は、植物体、植物器官、植物組織、植物細胞、および種子のいずれをも意味する。植物器官の例としては、根、葉、茎、および花などが挙げられる。植物細胞の例としては、カルスおよび懸濁培養細胞が挙げられる。

#### 【0132】

イネ科の植物の例としては、*Oryza*、*Hordeum*、*Secale*、*Saccharum*、*Echinochloa*、または *Zea* に属する植物が挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、モロコシ、トウモロコシなどを含む。

#### 【0133】

本発明の生産方法に用いられる植物は、好ましくは単子葉植物であり、より好ましくは、イネ科植物である。さらに好ましくは、イネであり得る。さらにより好ましくは、本発明の生産方法に用いられる植物は、日本晴、どんとこい、LGC-1、豊雪わい性品種、Tetep、Basmati であり得る。日本晴はゲノムシーケンスが公開されているので、遺伝子が導入されている染色体位置を容易に把握できることから好ましい。どんとこいは食味がよくコシヒカリより背が低くて作りやすいことから好ましい。LGC-1 はプロラミンアンチセンスがより効果的にでることから好ましい。豊雪わい性は植物体が非常に小さい（20 cm くらい）ものの種子は正常な大きさなのでインキュベーター内で生産できることから好ましい。Tetep、Basmati は、本州北陸地方以南の温帯地域において普通に栽培して種子を得ることができることから、ある実施形態において好ましい。

#### 【0134】

本明細書において、生物の「組織」とは、細胞の集団であって、その集団において一定の同様の作用を有するものをいう。従って、組織は、器官の一部であり得る。器官内では、同じ働きを有する細胞を有することが多いが、微妙に異なる働きを有するものが混在することもあることから、本明細書において組織は、一定の特性を共有する限り、種々の細胞を混在して有していてもよい。

## 【0135】

本明細書において、「器官」とは、1つ独立した形態をもち、1種以上の組織が組み合わさって特定の機能を営む構造体を形成したものをいう。植物では、カルス、根、茎、幹、葉、花、種子、胚芽、胚、果実、胚乳などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0136】

本明細書において「生物体」（または、植物の場合「植物体」）とは、当該分野における最も広義に用いられ、生命現象を営むもの（または植物）をいい、代表的には、細胞構造、増殖（自己再生産）、成長、調節性、物質代謝、修復能力など種々の特性を有し、通常、核酸のつかさどる遺伝と、タンパク質のつかさどる代謝の関与する増殖を基本的な属性として有する。生物には、原核生物、真核生物（植物、動物など）などが包含される。好ましくは、本発明では、生物は、植物であり得る。本明細書では、好ましくは、そのような植物体は稔性であり得る。より好ましくは、そのような植物体は、種子を生産し得る。

## 【0137】

本発明の遺伝子構築物、因子（agent）、組成物および方法は、単子葉植物だけでなく双子葉植物および動物を含む他の生物において機能することが企図される。

## 【0138】

本明細書において、「トランスジェニック」とは、特定の遺伝子がある生物に組み込むことまたは組み込まれた生物（例えば、植物（イネなど）を含む）をいう。

## 【0139】

本明細書では、植物の栽培は当該分野において公知の任意の方法により行うことができる。植物の栽培方法は、例えば、モデル植物の実験プロトコル「イネ・シロイヌナズナ編一」：細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ4；イネの栽培法（奥野員敏）pp. 28-32、およびアラビドプシスの栽培法（丹羽康夫）pp. 33-40（監修 島本功、岡田清孝）に例示されており、当業者であれば容易に実施することができることから本明細書では詳述する必要はない。例えば

、シロイヌナズナの栽培は土耕、ロックウール耕、水耕いずれでも行うことができる。白色蛍光灯（6000ルクス程度）の下、恒明条件で栽培すれば播種後4週間程度で最初の花が咲き、開花後16日程度で種子が完熟する。1さやで40～50粒の種子が得られ、播種後2～3ヶ月で枯死するまでの間に10000粒程度の種子が得られる。種子の休眠期間は短く、完熟種子は1週間程度乾燥させれば吸水後2～3日で発芽する。ただし、吸水・播種後2～4日間4℃で低温処理を行うと発芽が斉一化される。イネの栽培は主に土耕で行い、10000ルクス以上の光条件下で生育させる。播種後40日程度以後に短日条件とすることで出穂が誘導され、出穂誘導後30日程度で開花し、開花後40日程度で完熟種子が得られる。

#### 【0140】

植物細胞、植物組織および植物体の培養、分化および再生のためには、当該分野で公知の手法および培地が用いられる。このような培地には、例えば、Murashige-Skoog (MS) 培地、Gamborg B5 (B) 培地、White 培地、Nitsch & Nitsch (Nitsch) 培地などが含まれるが、これらに限定されるわけではない。これらの培地は、通常、植物生長調節物質（植物ホルモン）などが適当量添加されて用いられる。

#### 【0141】

本明細書において、植物の場合、その植物を「再分化」とは、個体の一部分から個体全体が復元される現象を意味する。例えば、再分化により、細胞（葉、根など）のような組織片から器官または植物体が形成される。

#### 【0142】

形質転換体を植物体へと再分化する方法は当該分野において周知である。そのような方法としては、Rogers et al., *Methods in Enzymology* 118:627-640 (1986); Tabata et al., *Plant Cell Physiol.*, 28:73-82 (1987); Shaw, *Plant Molecular Biology: A practical approach*. IRL press (1988); Shimamoto et al., *Nature* 338:274 (1989)

) ; Maliga et al., Methods in Plant Molecular Biology: A laboratory course. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995) などに記載されるものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、当業者は、上記周知方法を目的とするトランスジェニック植物に応じて適宜使用して、再分化させることができる。このようにして得られたトランスジェニック植物には、目的の遺伝子が導入されており、そのような遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

#### 【0143】

本発明による貯蔵タンパク質などの発現調節の解析は、DNAアレイを用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、(秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」)に広く概説されている。また、DNAアレイを用いた植物の解析についても最近行われるようになっていく (Schenk PMら (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 97:11655-11660)。

#### 【0144】

DNAアレイ技術において利用される微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fundamentals of Microfabrication, CRC 15 Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithographyなどに記載されており、これらは本明細書にお



いて関連する部分が参考として援用される。

【0145】

本発明による貯蔵タンパク質遺伝子およびその下流遺伝子などの発現の調節はまた、ディファレンシャルディスプレイ (differential display) 技術を用いた遺伝子解析でも解析することができる。

【0146】

本明細書において「ディファレンシャルディスプレイ (技術)」とは、発現変動する遺伝子を検出または同定するための方法である。この方法では、2つ以上のサンプルから cDNA をそれぞれ作製し、任意のプライマーセットを用いて PCR により増幅し、その後、生成された複数の PCR 産物をゲル電気泳動により分離し、パターン化した後、各バンドの相対的なシグナル強度変化をもとに、発現変動遺伝子がクローニングされる。

【0147】

本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

【0148】

本発明は、他の実施形態において、本発明のアンチセンス構築物に対する調節活性についての有効性のスクリーニングの道具として、コンピュータによる定量的構造活性相関 (quantitative structure activity relationship = QSAR) モデル化技術を使用して得られる化合物を包含する。ここで、コンピューター技術は、いくつかのコンピュータによって作成した基質鑄型、ファーマコフォア、ならびに本発明の活性部位の相同モデルの作製などを包含する。一般に、インビトロで得られたデータから、ある物質に対する相互作用物質の通常の特徴基をモデル化することに対する方法は、最近 CATALYST<sup>TM</sup> ファーマコフォア法 (Ekins et al., Pharmacogenetics, 9:477~489, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 288:21~29, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 290:429~438, 1999; Ekins e

t al.、J. Pharmacol. & Exp. Ther., 291:424~433, 1999) および比較分子電界分析 (comparative molecular field analysis; CoMFA) (Jones et al.、Drug Metabolism & Disposition, 24:1~6, 1996) などを使用して示されている。本発明において、コンピュータモデリングは、分子モデル化ソフトウェア (例えば、CATALYST<sup>TM</sup>バージョン4 (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA) など) を使用して行われ得る。

#### 【0149】

他の局面において、本発明は、本発明のアンチセンス構築物を含む組成物を提供する。そのような組成物は、農薬組成物であり得る。そのような農薬組成物は、日本の農林水産省または他の国における監督官庁が規定した規則にのっとった形式で提供される。そのような農薬組成物はまた、倫理的な問題も解決した形で提供される。

#### 【0150】

本発明が農薬組成物として処方される場合、そのような組成物には、農学的に受容可能なキャリアが含有され得る。そのようなキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

#### 【0151】

そのような適切な農学的に受容可能な因子としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または農学的アジュバント。代表的には、本発明の農薬組成物は、本発明の因子を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに組成物の形態で投与され得る。農薬組成物の場合は、そのようなキャリアは農薬投与に適切な水などであり得る。

#### 【0152】

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦

形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0-8.5のTris緩衝剤またはpH 4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。その溶液のpHはまた、種々のpHにおいて、本発明の因子の相対的溶解度に基づいて選択されるべきである。

#### 【0153】

組成物における溶媒は、水性または非水性のいずれかの性質を有し得る。さらに、そのビヒクルは、処方物の、pH、容量オスモル濃度、粘性、明澄性、色、滅菌性、安定性、等張性、崩壊速度、または臭いを改変または維持するための他の処方物材料を含み得る。同様に、本発明の組成物は、有効成分の放出速度を改変または維持するため、または有効成分の吸収もしくは透過を促進するための他の処方物材料を含み得る。

#### 【0154】

(好ましい実施形態の説明)

1つの局面において、本発明は、プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列のアンチセンス分子を提供する。詳細には、本発明は、プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列のに相補的な少なくとも10ヌクレオチド長、より好ましくは15ヌクレオチド長の連続する核酸配列または該核酸配列に対して少なくとも約70%相同な核酸配列を含む、核酸分子を提供する。そのような配列は、1つ以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を含んでいてもよい。そのような核酸分子を提供することによって、植物の種子において貯蔵する貯蔵タンパク質を含む、多重遺伝子族であるプロラミン遺伝子群全体の発現を抑制し、かつ他の貯蔵タンパク質の発現に中立であったことにより、種子タンパク質の低減化を実現し得ることが予想外に発見された。理論に束縛されることを希望しないが、一般には、ある種子タンパク質の発現が減少した場合には、ホメオスタシスの維持機構により他のタンパク質の発現が増大してその分を補うことで、種子タンパク質総量は変化しないというのが定説であり、事実グルテリン発現が抑制された系統では、その分がプロラミンに配分されて発現が著しく増大し、結果として種

子タンパク質総量はほとんど変化していないことが確かめられている。しかし、本発明においては、低グルテリンである系統でプロラミンの発現抑制を行っても、やはり低グルテリンの特徴は保持され、かつグロブリンが著しく増大することでもなかったことから、予想外の驚くべき成果と言える。

#### 【0155】

別の実施形態において、アンチセンス分子は、単純に逆向きの部分配列を持つものであってもよいが、RNAiの現象を利用して同一の逆向きの部分配列を2つ利用したヘアピン様RNA構造を用いてもよい。好ましくは、アンチセンス分子の発現を促進するために、10kDaプロラミンプロモーター、13kDaプロラミンプロモーター、グルテリンB1プロモーター、ユビキチンプロモーターなどが使用される。また、アンチセンス分子の発現の制御を行うために、Nosterミネーター、13kDaプロラミンプロモーター、10kDaプロラミンターミネーターなどが使用され得る。

#### 【0156】

上記核酸分子は、1つの実施形態において、アンチセンス活性を有する。具体的には、そのようなアンチセンス活性は、例えば、プロラミンのmRNAの発現量の減少、プロラミンポリペプチドの発現量の減少などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、本発明の核酸分子を植物に提供することによって、プロラミンのポリペプチドの発現量が減ったのみならず、種子中に発現されるタンパク質の量も減少することが予想外に発見された。そのような事象は従来見出されておらず、しかも示唆さえされていなかったことであり、本発明は顕著な効果を奏するといえる。

#### 【0157】

1つの実施形態において、上記プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列に相補的な少なくとも15ヌクレオチド長の連続的な核酸配列を含む。より好ましくは、そのような核酸配列は、少なくとも20ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも25ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも30ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも40ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも50ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも60ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも70ヌク

レオチド長の連続的な、少なくとも80ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも90ヌクレオチド長の連続的な、少なくとも100ヌクレオチド長の連続的な、核酸配列であってもよい。より好ましくは、そのような核酸配列は、プロラミンポリペプチドをコードする全長配列の相補配列を含むであってもよい。アンチセンス活性を発揮するには、通常15ヌクレオチド長の連続的な相補核酸配列を提供することで十分であり得るが、より確実にアンチセンス活性を発揮させるためには、より長い配列、例えば、少なくとも50ヌクレオチド長の、または少なくとも60ヌクレオチド長の連続的な核酸配列を提供することが好ましい。

#### 【0158】

本発明の核酸分子に含まれる上記核酸配列は、別の実施形態において、プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に相補的な核酸配列であり得る。プロラミンは、5'末端に相同性の高い配列が多いからである。また、そのような5'末端の配列に相補的な核酸配列を提供することによって、遺伝子の転写および／または翻訳が反応初期から阻害されることから、そうでない配列を提供するよりも効率よく遺伝子の発現を阻害することができるが、本発明では、アンチセンス効果を有する限り、目的とするポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端の配列に相補的な核酸配列以外の配列を使用してもよい。

#### 【0159】

本発明の核酸分子に含まれる上記核酸配列は、プロラミンに由来するものであればどのようなものでも使用することができるが、イネ13kDaプロラミンまたはそれに対応する他の種のオルソログに由来するものを使用することが好ましい。本発明において使用されるプロラミンは、イネのものであり得る。好ましくは、上記プロラミンは、ジャポニカ種のイネのものであり得る。さらにより好ましくは、上記プロラミンは、ジャポニカ種のイネ13kDaプロラミンである。最も好ましくは、上記プロラミンはRM9またはRM1のプロラミンである。

#### 【0160】

別の好ましい実施形態において、本発明の核酸分子は、

(a) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43および4

5 からなる群より選択される配列番号に示される核酸配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44 および 46 からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ配列を有するポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44 および 46 からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43 および 45 からなる群より選択される配列番号に示される核酸配列からなる DNA の対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44 および 46 からなる群より選択される配列番号に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはオルソログをコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70% である塩基配列からなり、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチド長の連続する核酸配列を含み得る。より好ましくは、この核酸配列は、少なくとも 20 ヌクレオチド長、より好ましくは、少なくとも 30 ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも 50 ヌクレオチ

ド長の連続する相補部分を含み得る。

【0161】

好ましい実施形態では、上記配列は、配列番号 1 または 3、ならびに配列番号 2 または 4 であり得る（それぞれ RM9 および RM1 に対応する）。

【0162】

別の局面において、本発明は、本発明の核酸分子を含むベクターを提供する。

【0163】

好ましくは、このベクターは、プロモーター配列などの調節配列（エレメント）を含み得る。調節配列としては、例えば、エンハンサー、プロモーター、転写終止配列、翻訳終止配列、転写起点、イントロン配列などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、このベクターは、プロモーター活性を有する配列をさらに含む。

【0164】

このプロモーター活性を有する配列は、好ましくは貯蔵タンパク質のプロモーターであり得る。貯蔵タンパク質のプロモーターであれば、種子中での転写促進活性が期待されるからである。本発明では、プロラミンのサブタイプにはよらず、どのサブタイプのプロラミンのプロモーター由来の配列であっても、別のプロラミンのアンチセンス配列の活性発揮に有用であることが判明した。このようなことは、従来予測できなかったことであり、本発明において初めて核にすることができた格別の効果である。

【0165】

より好ましくは、上記プロモーター活性を有する配列は、作動可能に連結されるアンチセンス配列が由来する構造遺伝子のプロモーターであり得る。

【0166】

好ましい実施形態では、プロモーターは、アンチセンス配列が由来する植物と同じ植物種起源であり得る。同じ植物種起源のものを使用する方が、より良好に機能することが期待されるからである。

【0167】

本発明のベクターは、好ましくは、ターミネーターをさらに含み得る。本発明

のベクターは別の実施形態において、選択マーカーをさらに含み得る。このような選択マーカーは、どのようなものでもよいが、簡便を考えると、抗生物質耐性付与遺伝子（例えば、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼなど）が好ましい。選択マーカーを含むベクターを使用する場合、本発明のアンチセンス構築物を用いて形質転換した植物細胞を選択することが極めて容易になるが、この選択マーカーは必ずしも必要というわけではない。

#### 【0168】

別の実施形態において、本発明のベクターは、アンチセンス配列とは異なる外来遺伝子（例えば、GFP遺伝子のようなマーカー遺伝子または有用遺伝子）をコードする配列を含み得る。このような外来遺伝子は、構造遺伝子であり得る。このような外来遺伝子は、大量に発現することが望まれるタンパク質であり得る。そのようなタンパク質としては、例えば、医薬活性のあるペプチド（例えば、サイトカイン類（インターロイキン類、ケモカイン類、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、multi-CSF（IL-3）、エリスロポエチン（EPO）、白血病抑制因子（LIF）、c-kitリガンド（SCF）のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類、血小板由来増殖因子（PDGF）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、肝実質細胞増殖因子（HGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）など）、ホルモン類（インスリン、成長ホルモン、甲状腺ホルモンなど）、ワクチン抗原、血液製剤、農業生産上有用なペプチド、例えば抗菌タンパク質、生理作用・薬理作用を持つ2次代謝産物を合成する様々な酵素や加水分解酵素、酵素反応を調節するインヒビター、血圧効果作用を持つとされるダイズグリシニン、あるいは消化管内で酵素分解を受けることで生理活性ペプチドが切り出されるようにデザインされた人工タンパク質といったものがあげられるがそれらに限定されない。また栄養学的に意義のある物質としては、カゼイン、マメ類のアルブミンやグロブリン、あるいはビタミン類・糖・脂質の合成酵素などがあげられるがそれらに限定されない。さらに様々な加工食品の原料として加工特性に関与するタンパク質として、例えばコムギグルテニン（製パン）、ダイズグロブリン群（豆腐



）、ミルクカゼイン群（チーズ）など、また食品の嗜好性や機能性を強化するタンパク質、例えばシクロデキストリンやオリゴ糖、 $\gamma$ アミノ酢酸などの特殊な糖・アミノ酸類の合成酵素群、外観を良くする色素合成酵素や味覚成分合成に関与するタンパク質群、あるいは、消化管内で酵素消化を受けることにより、生理作用をもつペプチド（例えば血圧効果作用をもつ、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドなど）が切り出されるようにデザインされた人工タンパク質などがあげられるがこれらに限定されない。

#### 【0169】

このような外来遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されていることが好ましい。この場合、そのようなプロモーターは、どのようなものでも使用することができるが、好ましくは、貯蔵タンパク質に由来するものが好ましい。より好ましくは、そのようなプロモーターとしては、プロラミンに由来するもの（10 kDa プロラミンプロモーター、13 kDa プロラミンプロモーターなど）が用いられる。

#### 【0170】

別の局面において、本発明は、本発明の核酸分子を含む植物細胞を提供する。あるいは、本発明はまた、本発明のベクターで形質転換した植物細胞を提供する。このような植物細胞は、本発明のベクターで一過的に形質導入されていてもよく、恒久的に形質転換されていてもよい。本発明の植物細胞はまた、本発明のアンチセンス構築物とは異なる外来遺伝子をコードする核酸分子を含み得る。そのような外来遺伝子の例示は、上述したとおりである。

#### 【0171】

好ましくは、本発明において利用されるプロラミンが由来する植物種と、本発明の植物細胞の植物種とは、同種であっても異種であってもよい。好ましくは、両者の植物種は同種であり得る。この両者の植物の品種は、同一品種であっても異なる品種であってもよい。好ましくは、両者の植物品種は、同一品種であり得る。好ましくは、本発明のプロラミンが由来する植物種および／または植物細胞の植物種は、イネであり得る。より好ましくは本発明のプロラミンが由来する植物種および／または植物細胞の植物種は、ジャポニカ種のイネであり得る。

## 【0172】

好ましい実施形態において、本発明の植物細胞には、本発明の核酸分子は、両側の染色体に導入され得るが、一対のみに導入されたものもまた有用であり得る。

## 【0173】

別の局面において、本発明は、本発明の植物細胞を含む植物組織を提供する。本発明はまた、本発明の核酸分子を含む、植物組織も提供する。そのような植物細胞または核酸分子は、上述の好ましい形態であり得る。

## 【0174】

したがって、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む植物組織（または生体の部分、部位など）を提供する。そのような植物の組織としては、例えば、種子またはそれに由来する部分が挙げられる。従って、プロテインボディを有する組織であればどのような組織でも使用され得る。好ましくは、本発明の組織は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターで形質されたものであり得る。本発明の組織は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターで一過的に形質転換されていても恒常的に形質転換されていてもよい。そのような形質転換によって導入された本発明のポリヌクレオチドは、構成的にまたは特異的に発現され得る。

## 【0175】

別の局面において、本発明は、本発明の核酸分子を含む植物体を提供する。このような植物体を提供することによって、低タンパク質含有種子を生産することができる。この植物体は、好ましくはイネであり得る。この植物体は、本発明のアンチセンス構築物とは異なる外来遺伝子をコードする核酸分子をさらに含み得る。そのような植物は、本明細書においてトランスジェニック植物ともいい、本発明の植物細胞または組織から当該分野において周知の技術を用いて再分化（再生）させることによって得ることができる。

## 【0176】

一旦所望のポリヌクレオチド（例えば、本発明のポリヌクレオチドまたはベクター）で形質転換された細胞（例えば、植物細胞）が得られたなら、一定の割合

以上でそのような形質転換細胞から所望のポリヌクレオチドを含むトランスジェニック生物（例えば、植物）が得られることは、当該分野において周知である。従って、形質転換することができる生物の細胞が利用可能な生物であれば、どのような生物でも本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含むトランスジェニック生物を生産することができる。

#### 【0177】

そのようなトランスジェニック生物を作製する方法は、当該分野において周知である。本発明の生物が植物である場合、トランスジェニック植物は、例えば、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換された細胞を増殖させ、組織または器官とし、それを再分化させることによって植物体とすることができる。そのような組織または器官は、どのようなものでもよく、例えば、カルス、根、莖などが挙げられるがそれらに限定されない。植物はどのような器官であっても、基本的に全能性を有していることから、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む器官または組織であれば、どのような組織または器官であっても植物体の再分化に利用することができる。本発明が木本植物の場合、本明細書において記載されるもののようなプロトコルを利用してトランスジェニック植物を作出することができる。

#### 【0178】

本発明の植物体において、プロラミンが由来する植物の種と、その植物体の種とは同種であっても異種であってもよい。好ましくは、その両方の種は同種であり得る。この場合、その両方の種は、同一品種であっても異なる品種であってもよい。好ましくは、両方の種は、同一品種であり得る。

#### 【0179】

好ましい実施形態では、本発明の植物体の植物種および／またはプロラミンが由来する植物種は、イネであり得る。より好ましくは、この両方の植物種は、ジャポニカ種のイネであり得る。このイネは、好ましくは、LGC-1であってもよい。

#### 【0180】

好ましい実施形態において、本発明の植物体には、本発明の核酸分子は、両側

の染色体に導入され得るが、一对のみに導入されたものもまた有用であり得る。

#### 【0181】

別の局面において、本発明は、本発明の植物体から生産された種子を提供する。この場合、本発明の植物体が本発明のアンチセンス構築物を含む場合、その種子におけるタンパク質含有量（特に、プロラミン）は顕著に低減している。したがって、そのような種子を食用に用いる場合、低タンパク質が好ましい用途において特に本発明の種子が有用であることが理解される。本発明の植物体がさらに外来遺伝子をコードする核酸分子を含む場合、そのような外来遺伝子がコードするポリペプチドの発現が顕著であることが認められる。したがって、本発明の種子は、有用タンパク質の生産装置（バイオリクター）として利用され得る。

#### 【0182】

本発明はまた、本発明の種子から調製されたデンプン調製物を提供する。このようなデンプン調製物は、プロラミンなどの貯蔵タンパク質を含むタンパク質含有量が顕著に減少している。したがって、そのようなデンプン調製物は、低タンパク質が好ましい用途において利用され得る。

#### 【0183】

また、本発明のデンプン調製物は、本発明の種子を生産する植物が外来遺伝子をコードする核酸分子を含む場合、その外来遺伝子がコードするポリペプチドを含む。そのようなポリペプチドは有用タンパク質であり得ることから、このようなデンプン調製物は、そのような有用タンパク質の原料として、またはそのような有用タンパク質が添加された食品を提供するために好ましい。

#### 【0184】

本発明は、本発明の植物体または本発明の種子から生産された外来遺伝子の遺伝子産物を含む組成物を提供する。そのような外来遺伝子の遺伝子産物は、本発明のシステムを用いることによって効率よく食用部分の中に生産されることから、食用として、医薬としてまたは他の用途として用いるのに非常に好ましい。

#### 【0185】

別の局面において、本発明は、植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させる方法を提供する。この方法は、A) 本発明の核酸分子を提供する工程；

B) 上記核酸分子を上記植物の細胞に導入する工程；C) 上記細胞を再分化させてトランスジェニック植物を作出する工程；およびD) 上記トランスジェニック植物から種子を得る工程、を包含する。ここで、本発明の核酸分子を提供する技術は、当該分野において周知であり、どのような技術を用いても本発明の核酸分子を提供することができることが理解される。核酸分子を植物の細胞に導入する技術もまた、当該分野において周知であり、そのような技術は、本発明において引用した文献などに十分記載されている。核酸分子の植物の細胞への導入は、一過的であっても恒常的であってもよい。一過性または恒常性の遺伝子導入の技術はそれぞれ当該分野において周知である。本発明において用いられる細胞を分化させてトランスジェニック植物を作出する技術もまた当該分野において周知であり、そのような技術は、本発明において引用した文献などに十分記載されていることが理解される。トランスジェニック植物から種子を得る技術もまた、当該分野において周知であり、そのような技術は、本発明において引用した文献などに記載されている。

#### 【0186】

したがって、このように、本発明の種子中のタンパク質の発現量を減少させる方法は周知の技術を用いて実施することができる。

#### 【0187】

本発明において用いる遺伝子導入技術は、当該分野において公知の技術であればどのような技術であっても使用することができる。好ましい実施形態において、本発明において用いる遺伝子導入工程は、アグロバクテリウム法を用いる。

#### 【0188】

好ましい実施形態において、本発明の植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させる方法はさらに、E) 本発明の核酸分子が導入された植物の細胞を選択する工程、を包含する。この工程を包含することにより、より効率よく、遺伝子導入植物を生育することができるが、本発明の実施においては必ずしも選択することが必要というわけではない。そのような選択方法は、導入された核酸分子の特性によって変動し、例えば、抗生物質（例えば、ハイグロマイシン、カナマイシンなど）に対する耐性遺伝子が導入された場合は、その特定の抗生物質を

用いて目的の細胞を選択することができる。あるいは、標識遺伝子（例えば、緑色蛍光遺伝子など）を用いれば、そのような標識を目安に目的の細胞を選択することができる。

#### 【0189】

別の局面において、本発明は、植物種子中で外来遺伝子を発現させる方法を提供する。この方法は、A) 本発明の核酸分子を提供する工程；B) 上記外来遺伝子をコードする核酸分子を提供する工程；C) 上記請求項1に記載の核酸分子および上記外来遺伝子をコードする核酸分子を上記植物の細胞に導入する工程；D) 上記細胞を再分化させてトランスジェニック植物を作出する工程；ならびにE) 上記トランスジェニック植物から種子を得る工程、を包含する。ここで、本発明の核酸分子および外来遺伝子をコードする核酸分子を提供する技術は、当該分野において周知であり、どのような技術を用いても本発明の核酸分子を提供することができることが理解される。これらの2つの核酸分子は、一緒に提供されてもよく、別々に提供されてもよい。好ましくは、同一のベクター中に両者が提供され得る。同一のベクター中に両者が提供されることにより、一度にその核酸分子を植物の細胞に導入することができる。

#### 【0190】

核酸分子を植物の細胞に導入する技術もまた、当該分野において周知であり、そのような技術は、本発明において引用した文献などに十分記載されている。核酸分子の植物の細胞への導入は、一過的であっても恒常的であってもよい。一過性または恒常性の遺伝子導入の技術はそれぞれ当該分野において周知である。本発明において用いられる細胞を分化させてトランスジェニック植物を作出する技術もまた当該分野において周知であり、そのような技術は、本発明において引用した文献などに十分記載されていることが理解される。トランスジェニック植物から種子を得る技術もまた、当該分野において周知であり、そのような技術は、本発明において引用した文献などに記載されている。

#### 【0191】

本発明の外来遺伝子の発現方法において用いる遺伝子導入技術は、当該分野において公知の技術であればどのような技術であっても使用することができる。好

ましい実施形態において、本発明において用いる遺伝子導入工程は、アグロバクテリウム法を用いる。本発明のアンチセンス構築物と、外来遺伝子をコードする核酸分子とが別々に提供され細胞に導入される場合、細胞への導入は、それぞれ同一の方法で行われてもよく、異なる方法で行われてもよい。

#### 【0192】

好ましい実施形態において、本発明の植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させる方法はさらに、F) 本発明の核酸分子が導入された植物の細胞を選択する工程、を包含する。この工程を包含することにより、より効率よく、遺伝子導入植物を生育することができるが、本発明の実施においては必ずしも選択することが必要というわけではない。そのような選択方法は、導入された核酸分子の特性によって変動し、例えば、抗生物質（例えば、ハイグロマイシン、カナマイシンなど）に対する耐性遺伝子が導入された場合は、その特定の抗生物質を用いて目的の細胞を選択することができる。あるいは、標識遺伝子（例えば、緑色蛍光遺伝子など）を用いれば、そのような標識を目安に目的の細胞を選択することができる。あるいは、外来遺伝子そのものが表現型に識別可能な差異を生じさせる場合は、そのような差異を目安に遺伝子導入細胞を選択してもよい。そのような識別可能な差異としては、例えば、色素の発現の有無などがあるがそれに限定されない。

#### 【0193】

本発明の外来遺伝子の発現方法はまた、好ましくはさらに、G) 上記種子から上記外来遺伝子の遺伝子産物を分離する工程、を包含する。

#### 【0194】

そのような遺伝子産物の分離技術は当該分野において周知であり、遺伝子産物（タンパク質またはmRNAなど）を分離することができる技術であれば、どのような技術を用いてもよい。したがって、本発明の形質転換体の培養物から、本発明の外来遺伝子の遺伝子産物のようなポリペプチドを単離または精製するためには、当該分野で周知慣用の通常のタンパク質の単離または精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明の形質転換体の細胞外に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、その培養物を遠心分離等の手法により

処理し、可溶性画分を取得する。その可溶性画分から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル（DEAE）－セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学）等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0195】

本発明の外来遺伝子の遺伝子産物のようなポリペプチドが本発明の形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、その細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモジナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。その無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル（DEAE）－セファロース（Sepharose）、DIAION HPA-75（三菱化学）等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用いることによって、精製標品を得ることができる。

#### 【0196】

また、本発明の外来遺伝子の遺伝子産物のようなポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈澱画分より、通常の方法によりそのポリペプチドを回収後、そのポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。この可溶化液を、



ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、本発明のポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。また、細胞内の特定のオルガネラ、例えば、プロテインボディに蓄積され得る場合には、そのオルガネラを分離後、タンパク質を精製することもできる。

#### 【0197】

通常のタンパク質の精製方法 (J. Evan. Sadlerら: *Methods in Enzymology*, 83, 458) に準じて精製できる。例えば、本発明の外来遺伝子の遺伝子産物のようなポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる [山川彰夫, 実験医学 (*Experimental Medicine*), 13, 469-474 (1995)]。例えば、Loweらの方法 (Larsen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 8227 (1989)、Kukowska-Latallo JF, *Genes Dev.*, 4, 1288 (1990)) に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

#### 【0198】

また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる (Larsen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 8227 (1989)、Kukowska-Latallo JF, *Genes Dev.*, 4, 1288 (1990))。

#### 【0199】

さらに、本発明のポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。本発明のポリペプチドは、公知の方法 [J. Biomolecular NMR, 6, 129-134, *Science*

e, 242, 1162-1164、J. Biochem., 110, 166-168 (1991) ] に準じて、*in vitro* 転写・翻訳系を用いて生産することができる。

#### 【0200】

本発明は、本発明の方法によって生産された、外来遺伝子の遺伝子産物を含む組成物を提供する。そのような組成物が含む遺伝子産物は、使用される外来遺伝子に応じて変動するが、好ましくはタンパク質であり得る。

#### 【0201】

別の局面において、本発明は、植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させるための、本発明の核酸分子の使用に関する。

#### 【0202】

他の局面において、本発明は、植物の種子中で外来遺伝子を発現させるための、本発明の核酸分子の使用に関する。ここで、外来遺伝子が発現される植物の種子において、植物の天然のタンパク質発現が低減していることが好ましい。天然のタンパク質発現が低減することによって、目的とする外来遺伝子の遺伝子産物（特に、タンパク質）の発現は、顕著に効率的となる。

#### 【0203】

これらの各々の使用において、その各要素について本明細書において詳細に説明した好ましい実施形態は、そのまま適用することができることが理解される。

#### 【0204】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

#### 【0205】

##### 【実施例】

(実施例 1：アンチセンス構築物の作製)

本実施例では、本発明の例示として以下に示すアンチセンス配列を以下に示すプロモーター配列と組み合わせたアンチセンス構築物を構築した。

#### 【0206】

プロモーター配列:

A) イネ10kDaプロラミン遺伝子に由来する配列 (配列番号47)

B) イネグルテリンB1遺伝子に由来する配列 (配列番号48)

C) CaMV35S遺伝子に由来する配列 (配列番号49)

アンチセンス配列:

A) 13kDaプロラミンをコードするcDNA全長 (配列番号1) のアンチセンス (配列番号50)

B) 13kDaプロラミンをコードするcDNAのN末端の67bpのアンチセンス (配列番号51)

C) 13kDaプロラミンをコードするcDNAのN末端の15bpのアンチセンス (配列番号52)

D) コントロール配列 (配列番号53)

アンチセンス構築物の構築は以下のようにして行った。

#### 【0207】

上述の組み合わせの配列および形質転換のイネの選抜用として、ハイグロマイシンに対する抵抗性を付与するカセットとして、CaMV35Sプロモーター (配列番号49)、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (配列番号54) およびNosターミネーター (配列番号55) を含むものを使用した。

#### 【0208】

以後の発現ベクター構築には、大腸菌JM109を用いて、分子生物学実験における常法に従って行った。

#### 【0209】

一連の遺伝子構築操作に先立って、構築過程の効率化のために、図1に示すような改変ベクターを構築した。過程を概説すると、オリジナルである2つのベクターpUC19およびバイナリーベクターpPZP202 (Plant Molecular Biology 25, 989-994, 1994) をベースに、当該分野において公知の (Transgenic Research 4, p 288-290, 1995) の方法を参考にして8塩基認識部位AscIおよびPacIを導入した改変ベクターpUC198AP、pUC198AA、pUC

198PPおよびpPZP2028を構築した。また、選抜マーカー遺伝子であるHPT遺伝子は、内部にあるEcoRI、PstI、NcoI部位を部位指定変換で消去した改変遺伝子mHPTを作製し（アミノ酸配列番号56）、それをCaMV35Sプロモーターおよびnosターミネーターと制限酵素で切断されないように連結した選抜マーカー発現カセット（塩基配列番号57）として構築した。これを、やはり制限酵素で切断されないようにpPZP2028に組み込んでpZH2Bを構築した。また、イネポリユビキチンプロモーター断片についても、配列中に存在するXbaI、EcoRI、PacI、SpeI、PstI、XhoIを、やはり部位指定変換で消去した改変イネポリユビキチンプロモーター（mRUBiP、配列番号58）を構築しておいた。

#### 【0210】

具体的な発現ベクターの構造の例を図2に示した。まずpZH2BベクターのSacI-EcoRIにターミネーターを連結し、次にHindIII-XbaIにプロモーターを連結した。アンチセンス用遺伝子フラグメントは、XbaI-SacI部位の間に連結した。RNAiタイプの2本鎖RNA発現ベクターについては、SacI-EcoRIにnosターミネーター、HindIII-XbaIに改変イネポリユビキチンプロモーターを連結した後、図2に示した制限酵素部位（5'側にXbaIとBglII、3'にSpeIとBamHI）を両側に付加したGUS遺伝子断片（配列番号59）またはイネアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子イントロン配列（配列番号97）をXbaI-BamHIに連結することで、基本となるRNAi発現ベクターを構築した。あとは、抑制をかける適当なプロラミン遺伝子断片を1種類選び、XbaIまたはBglIIに1つ、SpeIまたはBamHIに1つ、向きが逆になるように連結して完成させた。

#### 【0211】

目的としたアンチセンス発現ベクターが構築されているかどうかは、各断片を増幅するPCRプライマーを用いたPCR、および／またはDNA配列決定を行うことで確認した。

#### 【0212】

ベクターは、以下の実施例において使用するまで、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 【0213】

(実施例 2 : アンチセンス構築物を用いたイネの形質転換)

実施例 1 において生産したアンチセンス構築物を含むベクターを用いて、イネ 2 品種 (日本晴および LGC-1) を形質転換し、トランスジェニックイネを生産した。日本晴は、イネとして代表的な品種として使用した。LGC-1 は、ニホンマサリの放射線変異によるイネで、種子中のグルテリン量が大きく低下し、プロラミンが増加していることから、本発明のプロラミンへの影響をより明確に確認するために使用した。

### 【0214】

その具体的な手順は以下のとおりである。

### 【0215】

図 2 に示したそれぞれのアンチセンスプロラミン遺伝子発現ベクターは、まずアグロバクテリウム EHA101 にエレクトロポレーションで導入し、ベクターを保持した菌を  $100\text{ mg/L}$  のスペクチノマイシンを含む LB 寒天培地で選抜した。アグロバクテリウム感染までは、Raineri らの方法 (Raineri DM., Bio/Technology 8, 33-38, 1990) を一部改変して実施し、感染以降の培養操作と培地については、Toki らの方法 (Toki. S., Plant Molecular Biology Reporter 15, 159-164, 1997) に従って行った。Toki らの方法で形質転換イネが得られない品種については、Fukuoka らの方法 (Fukuoka H. et al., Plant Cell Reports 19, 815-820, 2000) に記された培地組成に従って行った。

### 【0216】

手順を簡単に記述するが、特に断りがないかぎり、イネ細胞は  $28^{\circ}\text{C}$  にて培養した。また、培地の支持体は 0.4% 濃度のゲルライト (和光純薬) を用いた。初めはすしたイネの種子を 70% エタノールにつけ、続いて有効塩素濃度 2% 程度の次亜塩素酸に浸せきすることで殺菌し、十分な滅菌水で洗浄の後、 $2\text{ mg/L}$  の 2,4-D を含むカルス誘導培地 ( $\text{KNO}_3$   $2830\text{ mg/L}$ ,  $(\text{NH}_4$

)  $2\text{SO}_4$  460mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  166mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  185mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  400mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{EDTA}-2\text{Na}$  37.3mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  4.4mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5mg/L,  $\text{KI}$  0.8mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.6mg/L, ニコチン酸0.5mg/L、チアミン塩酸1.0mg/L、ピリドキシン塩酸0.5mg/L、グリシン2mg/L、ミオイノシトール100mg/L、プロリン2.88g/L、カザミノ酸300mg/L、ショ糖30g/L、 $\text{pH}=5.8$ )に置床し培養した。5日後、置床した種子をそのまま回収し、導入目的遺伝子を保持したアグロバクテリウムをAAM培地 ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  150mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  250mg/L,  $\text{Fe}-\text{EDTA}$  40mg/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  150mg/L, ニコチン酸1mg/L、チアミン塩酸10mg/L、ピリドキシン塩酸1mg/L、ミオイノシトール100mg/L、L-アルギニン174mg/L、グリシン7.5mg/L、 $\text{pH}=5.2$ )にけん濁した菌液(濃度は $\text{OD}_{600}=0.03$ 程度にあわせる)に2分間つけこみ、滅菌ペーパータオル上で水気をきって、2mg/Lの2,4-Dを含む共存培養培地 ( $\text{KNO}_3$  2830mg/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  460mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  166mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  185mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  400mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{EDTA}-2\text{Na}$  37.3mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  4.4mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5mg/L,  $\text{KI}$  0.8mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.6mg/L, ニコチン酸0.5mg/L、チアミン塩酸1.0mg/L、ピリドキシン塩酸0.5mg/L、グリシン2mg/L、ミオイノシトール100mg/L、グルコース10g/L、カザミノ酸300mg/L、ショ糖30g/L、 $\text{pH}=5.2$ )へならべた。25℃暗所で3日間培養した後、十分な滅菌水で種子を洗浄し、最後に500mg/Lのカルベニシリンを含む滅菌水に5分間つけた。

このようにしてアグロバクテリウムを完全に除去した種子は、ハイグロマイシン 50mg/Lの濃度で含む選抜培地 ( $\text{KNO}_3$  2830mg/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  460mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  166mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  185mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  400mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{EDTA}-2\text{Na}$  37.3mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  4.4mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5mg/L,  $\text{KI}$  0.8mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.6mg/L, ニコチン酸0.5mg/L、チアミン塩酸1.0mg/L、ピリドキシン塩酸0.5mg/L、グリシン2mg/L、ミオイノシトール100mg/L、プロリン2.88g/L、カザミノ酸300mg/L、ショ糖30g/L、 $\text{pH}=5.8$ )で2週間培養した。その後、胚乳と芽をはずした細胞塊を、やはりハイグロマイシン50mg/Lの濃度で含む、かつホルモンとしてカイネチン2mg/L, NAA 0.02mg/Lを含む再分化培地 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650mg/L,  $\text{KNO}_3$  1900mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  440mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  370mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1700mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{EDTA}-2\text{Na}$  37.3mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{KI}$  0.83mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2mg/L, ニコチン酸0.5mg/L、チアミン塩酸0.1mg/L、ピリドキシン塩酸0.5mg/L、グリシン2mg/L、ミオイノシトール100mg/L, カザミノ酸2g/L、ショ糖30g/L、ソルビトール30g/L、 $\text{pH}=5.8$ )におきかえ、同じ培地に1週間ごとに3回うえつぎを行った。途中、緑化してシュートを生じた細胞集団1つにつき、生長の旺盛なシュートを2本選んでハイグロマイシン50mg/Lを含むホルモンフリー培地 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650mg/L,  $\text{KNO}_3$  1900mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  440mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  370mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{EDTA}-2\text{Na}$  37.3mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

8. 6 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L, KI 0.83 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 mg/L, ニコチン酸 0.5 mg/L、チアミン塩酸 0.1 mg/L、ピリドキシン塩酸 0.5 mg/L、グリシン 2 mg/L、ショ糖 30 g/L、 $\text{pH}=5.8$ ) にうつしかえた。約 1 ヶ月後、2 本のうち十分に育ったほうのシュートを鉢に植え、隔離温室または陽光定温器内で育成して種子を収穫した。別々の細胞集団より再分化したシュートは、独立の組換え系統として扱った。

#### 【0217】

このようにして得た形質転換体は、このベクター中にコードされるハイグロマイシン遺伝子によりハイグロマイシンに対する抵抗性を付与されていた。

#### 【0218】

##### (実施例 3：形質転換体の生育)

市販の培養土（微量栄養素入りのホーネンス培養土）をビニールポット（直径 15 cm）に入れ、ホルモンフリー培地にうつして 1 ヶ月経過したイネ植物体を移植した。通常は、それを隔離温室で天然光の下でおいて種子を実らせた。場合によっては、人工気象器（日本医化 FH301 など）内で、16 時間明期（15000 ルクス以上、30℃）－8 時間暗期（25℃）のサイクルで 2 ヶ月、続いて 12 時間明期（15000 ルクス以上、30℃）－12 時間暗期 25℃）のサイクルで 2 ヶ月～3 ヶ月おいて種子を実らせた。

#### 【0219】

##### (実施例 4：組換え当代の種子タンパク質の電気泳動による分析)

実施例 3 において収穫した種子を用いて、種子内に存在するタンパク質の状態について解析した。その詳細な手順を以下に示す。

#### 【0220】

当該分野において周知の技法である、SDS-PAGE 方を用いて、18%濃度のアクリルアミドゲルにより種子タンパク質の組成を解析した。独立な 1 つの組換えイネ系統あたり、種子を任意に 12 粒選んで 1 粒ずつ番号をつけ、対応関係がわかるように 2 分割し、胚のついた半分をハイグロマイシン 50 mg/L を



含むホルモンフリー培地に播種した。のこり半粒は、折りたたんだアルミホイルにはさんでハンマーでたたいて良く粉碎し、種子タンパク質抽出バッファー（25 mM トリス、pH 6.8、8 M 尿素、5 % の 2-メルカプトエタノール、4 % SDS を含む）を 200 マイクロリットル入れてボルテックスを 1 分かけてタンパク質を抽出した。遠心操作後の上清を 8 マイクロリットルとりわけ、色素溶液（25 mM トリス、pH 6.8 で 10 % グリセロール、0.025 % ブロムフェノールブルー、5 % 2-メルカプトエタノールを含む）2 マイクロリットルと混合した後にゲルで電気泳動し、クマシーブリリアントブルーで検出した。タンパク質量の簡易的定量としては、上記ゲルのバンドの濃度を One D / Zero D Scan (Analysistix Inc.) により測定した。

#### 【0221】

##### （系統選抜）

上記の分析で 13 KDa プロラミンがおおむね 50 % 以下になっている系統を選抜した。種子を次世代の種子を収穫し、再びハイグロマイシンを含むホルモンフリー培地（ $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650 mg/L,  $\text{KNO}_3$  1900 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  440 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  370 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8 mg/L, EDTA-2Na 37.3 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3 mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L, KI 0.83 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 mg/L, ニコチン酸 0.5 mg/L、チアミン塩酸 0.1 mg/L、ピリドキシン塩酸 0.5 mg/L、グリシン 2 mg/L、シヨ糖 30 g/L、pH=5.8）への播種と電気泳動による確認を行った。これを 3 世代分繰り返し、ランダムに選んだ 10 粒すべての種子が同じように 13 KDa プロラミンが 50 % 以下になった系統を詳細に調べた。種子 5 粒を乳鉢で粉碎して 15 ml のチューブに入れ、5 ml のジエチルエーテルを加えて激しく攪拌して脱脂を行い、遠心後にエーテルを除去し、残った種子粉末をドラフト内で乾燥させた。次に、5 ml の 25 mM トリス緩衝液（pH 6.8）を加えて激しく攪拌して水溶性タンパク質を

抽出し、再度遠心して種子粉末を回収した。ここに種子タンパク質抽出バッファを 2.5 ml を加えて激しく攪拌して、遠心処理後の液層を種子タンパク質抽出液とした。

#### 【0222】

以上の結果を図 3 に示す。主要な貯蔵タンパク質は、ゲル写真右に提示してある。レーン 1、2 および 7 にあるような一般品種（日本晴、ニホンマサリ）ではグルテリン（D と F）がもっとも多く、次いで 13 KDa プロラミン（B）が多い。これらにプロラミンアンチセンス遺伝子を導入すると、レーン 4、5 にあるように 13 KDa プロラミン（B）が著しく減少し、また 10 KDa や 16 KDa プロラミンもやや減少した。グルテリンやグロブリンの発現に変化はなかった。

#### 【0223】

また、レーン 3、8 にあるように、ニホンマサリの放射線突然変異で低グルテリン含量イネ（LGC-1）では、その反動としてプロラミン（A～C）およびグロブリン（F）が著しく増大して、グルテリン含量の低下の大部分を相殺している。しかし、これにプロラミンアンチセンス遺伝子を導入すると、レーン 6 にあるように、プロラミン（A～C）の含量は著しく減退し、一方で低グルテリン含量の特徴が保持され、かつグロブリンも増えていなかった。このようにして、本発明の遺伝子はいずれの品種に導入しても、プロラミンを低下させ、おおむねその分だけ種子タンパク質が減少することがわかり、低タンパク質米の作出に非常に有効であることがわかった。

#### 【0224】

また、図 4 においていろいろな構築遺伝子を導入した系統の種子を分析した結果を示したが、ハイグロマイシン耐性の形質を持った種子では、プロラミン低減がおきていることがわかり、プロラミン低減の効果は導入遺伝子に由来することを確認した。

#### 【0225】

（デンストメータによる測定）

次に、タンパク質量を相対的に数値化して比較するために、SDS-PAGE

のゲルをデンシトメータにより測定した。上記の抽出液を適量（例えば $5\mu\text{l}$ 、 $15\mu\text{l}$ 、 $30\mu\text{l}$ ）用いてSDS-PAGEを行い、同様にバンドの濃度を定量してタンパク量を推定した。また、電気泳動後にPVDF膜に転写し、それにウエスタンブロットキット（BioRad社など）に従って、抗 $13\text{KDa}$ ポリクローナル抗体を用いて $13\text{KDa}$ プロラミンを検出した。検出したバンドについては、SDS-PAGEと同様に濃度を定量してタンパク量を推定した。デンシトメータの結果をしたの表に示したが、貯蔵タンパク質の吸光値の合計は、プロラミンアンチセンス遺伝子を導入した系統が明らかに少なく。低タンパク化が達成できていることを示している。また、図5にウエスタンブロットの結果を示すが、原品種に比較して、 $13\text{KDa}$ プロラミンを認識するバンドの吸光値は $10\%\sim 28\%$ まで低下しており、SDS-PAGEでの測定結果より、さらにプロラミンが低減している可能性も示唆された。

#### 【0226】

デンシトメータで測定した主要な貯蔵タンパク質のバンド濃度結果を以下の表に示す。

#### 【0227】

【表 1】

デンスドメータで測定した貯蔵タンパク質バンドの吸光値

イネ系統	日本晴	LP13K G9-ORFAS	LP13K P9-ORFAS	LP13K P1-67bAS	ニホンマサリ	LGC1	LG-LP13K P9-ORFAS
グルテリン酸性	1630.4	1698.8	1636.3	1541.3	1488.9	722.8	912.8
グロブリン26KDa	266.9	277.4	229.5	261.9	301.9	432.1	402.4
グルテリン塩基性	1227	1301.1	1236.1	1154.9	1168.2	505.8	658.7
プロラミン16KDa	310.5	278.9	297.3	304.2	364.1	478.5	343.5
プロラミン13KDa	760	378.5	360.9	310.9	684.7	1453	556.1
プロラミン10KDa	107.9	102.7	81.2	38.3	134.7	133.2	135.2
合計	4302.7	4037.4	3841.3	3611.5	4142.5	3725.4	3008.7

【0228】

上記表からも明らかなように、本発明のアンチセンス構築物は、プロラミンの発現を減少させたのみならず、他の貯蔵タンパク質に対しても抑制または中立の効果をもっていた。この結果は、低グルテリン植物においてプロラミンが増加し、結果として種子タンパク質の総量がほとんど変化していなかったこととは全く異なるものである。このようなことは予想外の結果である。

#### 【0229】

##### (窒素量測定)

粗タンパク質含量がどのように変化しているかを、玄米窒素含有量を測定して検証した。簡潔に述べると以下のとおりである。方法は、窒素量の化学分析の常法であるケルダール法を用いた。種子10粒を専用試験管に入れ、そこに分解促進剤と水2mL、硫酸5mLを加えて370℃で加熱分解し、手で持てるくらいに冷えた後に試験管標線まで静かに蒸留水を注いで希釈した。この状態で、種子の窒素はアンモニア-アンモニウムとなって硫酸の中に保持されている。この分解液10mLに、等量の30%水酸化ナトリウムを添加し、水蒸気蒸留して発生したアンモニアを、飽和ホウ酸溶液にトラップした。このホウ酸溶液にpH指示薬を入れ、塩酸で滴定して中和点より、アンモニア量を定量し、そこから窒素量を算出した。その結果を以下の表に示す。

#### 【0230】

【表 2】

玄米窒素含有量 $\mu\text{g}/1\text{粒}$ 相対値	日本晴	LP13K	ニホンマサリ	LGC-1	LG-LP13K
	286.4 100	269.8 94.2	286.2 100	287 100	257.9 90.1

## 【0231】

プロラミンアンチセンス遺伝子を導入した系統では、原品種よりも種子窒素含有量が低く出ており、粗タンパク質含量も減少している。それが貯蔵タンパク質の減少に由来することは明白である。

## 【0232】

上述の表からも明らかなように、本発明のアンチセンス構築物は、種子タンパク質の窒素含有量すなわち、種子タンパク質量を有意に減少させたことが分かり、すなわち、低タンパク質化を達成しているといえる。

#### 【0233】

(結果)

以上をまとめると、本発明の上記構築物を用いると、13kプロラミンの発現量は顕著に減少した。他のプロラミン(10k、16k)もまた、同等であるか若干の減少を示した。グルテリンおよびグロブリンの発現は、本発明の上記構築物を導入する前の原品種と同等であった。従って、この結果から、本発明の構築物は、種子タンパク質の総発現量を顕著に減少させるといえる。

#### 【0234】

(実施例5：独立な系統より得られた種子の電気泳動パターン)

次に、1穂に実った種子について、複数の種子を抽出し、実施例4に記載のように電気泳動により解析した。これによれば、ハイグロマイシン耐性の形質を示す種子では、プロラミン低下の形質が見られたことから、本発明のアンチセンス構築物が片方の染色体にさえ挿入されていれば、プロラミン抑制に充分であることが示されたことになる。

#### 【0235】

(実施例6：アンチセンス効果)

次に、本発明のアンチセンス構築物のアンチセンス効果を確認するために、独立して組換えイネを複数作出し、分析を行った。その手順および結果を以下に示す。

#### 【0236】

本発明のプロラミンアンチセンス遺伝子の構造と、それがもたらすプロラミン低減効果の関係について、いろいろな種類の構築遺伝子について組換えイネを作出した。それぞれについて10以上の独立な系統の種子を、系統選抜の方法に従って10粒ずつ分析して以下のように結果をまとめた。

#### 【0237】

【表3】

番号	品種	プロモーター配列	アンチセンス配列
A	日本晴	10kDaプロラミン	13kDaプロラミンcDNA 全長
B		グルテリンB1	
C		CAMV35S	
D		10kDaプロラミン	13kDaプロラミンcDNA のN末端67bp
E		グルテリンB1	
F		CAMV35S	
G	LGC-1	10kDaプロラミン	13kDaプロラミンcDNA 全長
H		グルテリンB1	

## 【0238】

これらの形質転換イネを、1) 13kDaプロラミン量が低下した種子を1粒以上つけた系統数、2) 13kDaプロラミン量が非形質転換体の50%以下になった種子をつけた系統の数、3) ハイグロマイシン抵抗性を示した種子のすべてにおいて13kDaプロラミン量が低下していたものについて解析した。

## 【0239】

1) 13kDaプロラミン量が低下した種子を1粒以上つけた系統数は、13kDaプロラミンの発現量が20%減少した種子を計数した。

## 【0240】

2) 13kDaプロラミン量が非形質転換体の50%以下になった種子については、非形質転換体の種子抽出物と比較対照の種子抽出物とを電気泳動のゲル上での比較によって行った。

## 【0241】

3) ハイグロマイシン抵抗性については、ハイグロマイシン含有培地において生存する個体を選択した。プロラミン量の低下については、1) と同様の判断基



準を採用した。

# 【0242】

実際の比較は、電気泳動後のゲルをゲルリーダーで読み取り、その指数の絶対値に関して、非形質転換体を100%とすることによって比較対照のものの値を算出した。

# 【0243】

以下に結果を示す。

# 【0244】

【表4】

番号	解析したイ ネ系統数	1) プロラミ ン低下系統数 *	2) 50%以 下の種子の 系統数**	3) ハイグロマ イシン抵抗性お よびプロラミン 低下系統数***
A	79	60	45	32
B	56	22	14	6
C	20	2	0	0
D	15	5	3	1
E	68	0	0	0
F	21	0	0	0
G	24	21	12	6
H	18	7	3	0

# 【0245】

\* 13kDaプロラミン量が低下した種子を1粒以上つけた系統数；

\*\* 13kDaプロラミン量が非形質転換体の50%以下になった種子をつけた系統数；

\*\*\* ハイグロマイシン抵抗性を示した種子のすべてにおいて13kDaプロラミン量が低下していた系統数

上記項目1および2の結果は、構築物に13KDaプロラミンの発現を抑制す

る力がどのくらいあるかをはかる指標であり、それぞれの項目で数字が大きい程、効率的であることを示す。本発明のアンチセンス構築物は、対象となる 13 KDa プロラミンの発現を効率良く抑制している様子がうかがえるが、構築物の構造（特にプロモーター）によって、効率に差が有ることも示している。項目 3 の結果では、ハイグロマイシン抵抗性とアンチセンスの表現形が完全には一致しないケースが出ていることをしめす。このことは、2 対ある染色体のいずれか一つに導入遺伝子が入っただけでは 13 kDa プロラミンの抑制効果を十分に発揮できない場合があることを示す。従って、本発明では、2 ついある染色体の両方に導入遺伝子が入ることが好ましくあり得る。一般に組換えイネにおいては、導入された遺伝子はランダムに染色体に組みこまれ、その入った位置などによって発現の程度に差が出てくることがよく知られている。同じ遺伝子を導入した 100 の個体を作っても、導入遺伝子が良く発現する個体から全く発現しない個体まで、発現程度がばらつくことは、当業者においては常識のことである。また、遺伝子の発現があまりない個体においては、片方の染色体に組み込まれた個体と両方の染色体に組み込まれた個体と、また導入遺伝子が 1 つ入った個体と 2 つ入った個体で表現型に差が出る場合があることもしられている。本来は、図 4 にのせたように片方の染色体に 1 つのアンチセンス構築物が挿入されていれば、アンチセンス効果を発揮し得るのであるが、例えば、染色体上の挿入位置が悪い場合には、アンチセンス構築物の個数により表現型にばらつきがでてくることは十分にあり得るのである。

#### 【0246】

以上のように、1、2 およびこの項目 3 で示された数字が大きい程、高い確率で安定してアンチセンス効果を発揮し得る優れた構築物ということができる。その意味では、10 KDa プロラミンプロモーターが、他のプロモーターと比較してアンチセンス効果が強く出ている系統が得られやすく、またアンチセンスに使う遺伝子断片を短くした場合（67～15 bp）にも効果を発揮することがわかった。従って本発明は非常に有用性が高いことを示す。

#### 【0247】

（実施例 7：透過電顕写真によるプロテインボディでの観察）

次に、実施例 6 で作出された種子におけるプロテインボディを観察した。プロテインボディの観察は、以下の手順で行った。

#### 【0248】

開花した籾にマーキングし、7 日、10 日、14 日、21 日後にサンプリングした。すぐに種子の上下にカミソリで切れ目を入れた後、3 %グルタルアルデヒド溶液に入れ、氷上、減圧条件下で 15 分、その後 4℃で 12 時間以上おいて、固定処理を行った。種子を 3 分割し、LR-White 樹脂（応研商事より販売）に包埋し固化させた後に、ダイヤモンドナイフを用いて 90 μm の切片を切り出した。以下、通常の透過型電顕サンプル処理方法に従って切片を処理し、胚乳表層の細胞について日本電子の透過型電顕を用いて観察した。

#### 【0249】

その結果を図 6 に示す。6 a においては、観察写真をそのままのせた。やや薄いグレーで滑らかな球形をしているのは、プロラミンが蓄積するプロテインボディ 1、それより濃い色で大型でややいびつな形をしたのがグルテリンとグロブリンが蓄積するプロテインボディ 2 である。タンパク質顆粒がぎっしりつまっている様子がよく見える。6 b には、6 a と同じ写真にプロテインボディのタイプをマーキングして表示した。同一面積の視野で観察すると、LP13K 系統（6 b-1）では、一般品種（6 b-2）と比較して、明らかにプロテインボディ 1 の数が少ないことが見て取れる。このことは、プロテインボディ 1 の形成には 13 KDa プロラミンが重要な役割を果たしており、その発現を制御することでプロテインボディ形成数を制御できることを示している。一方、低グルテリンかつ高プロラミンの特徴を持つ LGC-1（6 b-3）においては、プロテインボディ 2 の数とサイズは大きく減少する一方で、プロテインボディ 1 の数は大きく増加しており、グルテリンの減少分がプロラミンに分配されている様子がよく見て取れる。LG-LP13K（LGC-1 にプロラミンアンチセンス遺伝子を導入）した系統では、2 つのプロテインボディが共に減少している様子が観察された（データは示さない）。糠層ほどではないとしても、胚乳細胞の表層はタンパク質に非常に富み、食用・加工用いずれにおいてもできるだけ除去する方が好ましいことが知られているが、プロラミンアンチセンス遺伝子の効果で表層のタンパク

質がを大きく減少させていれば、そのような過程を簡略化しても同等の品質の製品が得られるメリットがある。また、種子のホメオスタシスの仕組みにより、低下したタンパク質を別のもので補おうとするはずであり、そこに有用タンパク質の遺伝子を強制発現させてやれば、優先的にアミノ酸が分配されて、おそらくはこの表層細胞内に蓄積すると期待される。

#### 【0250】

開花後2週間を経過した種子をその結果を図6aに示す。図6aにおいて、1) は一般的な品種の種子の胚乳細胞の透過電顕写真を示す。2) は本発明のアンチセンス構築物で組み換えられたイネの種子の胚乳細胞の透過電顕写真を示す。3) は、LGC1の写真を示す。

#### 【0251】

写真において、やや薄いグレーで滑らかな球形をしているのがプロラミンが蓄積するタンパク質顆粒（プロテインボディ1）であり、濃い色で大型でややびつな形をしているのがグルテリンおよびグロブリンが蓄積するタンパク質顆粒（プロテインボディ2）である。同じ写真にプロテインボディのタイプわけを表示したのが図6bである。

#### 【0252】

同じ倍率で画面をみて比較すると、本発明の1例であるLP13Kでは、明らかにプロテインボディ1の数が少ない。このことは、13Kプロラミンだけを抑制することが、タンパク質顆粒の数を制御することにつながることを意味するといえ、本発明で初めて明らかになった成果である。したがって、外来タンパク質の効率的な発現系、特にプロテインボディ2に外来タンパク質を蓄積させようとする場合に適しているといえる。

#### 【0253】

（実施例8：他のアンチセンス構築物の作製）

次に、他のプロラミン遺伝子のアンチセンスおよびプロモーターでも同様の効果が出ることを確認した。この実施例で作製したプロモーター配列およびアンチセンスの配列は、配列番号63～72に示されている。

#### 【0254】

この配列を用いて、実施例 1～7 に示される手順にしたがって、効果の解析を行ったところ、これらのアンチセンス配列についても同様のプロラミンおよび種子タンパク質抑制効果があることが観察された。

#### 【0255】

このことは、アンチセンス効果が、そのプロラミンのみならず、他にもあることを示す。

#### 【0256】

次に、実施例 6 に記載のように、アンチセンス効果についてさらなる分析を行ったところ、同様に、アンチセンス効果があったことおよび 15 bp または 20 bp のような短い配列でも効果があったことが実証された。

#### 【0257】

(実施例 9：他の品種における効果)

次に、他の品種でも同様の効果が出るかどうか調べた。

#### 【0258】

この実施例では、本発明のアンチセンス構築物を用いて、他の品種でも同様の効果が得られるかを検証した。対象にはこれまでの実施例で使用していないジャポニカ、またはインディカ種である、Te Tep、Basmati、IR8、湖南早を選んだ。形質転換以降の操作は、すべて実施例 2～4 と同様に行った。図 7 にこれらの品種の種子タンパク質の電気泳動パターンと、日本晴のプロラミンをウサギに免疫して得られた抗 13 KDa プロラミンポリクローナル抗体を用いてウエスタン解析を行った結果である。一見してわかるとおり、どの品種においても電気泳動パターンは極めて類似しており、抗体とも非常によく反応していることから、プロラミン遺伝子が品種間でも高度に保存されていることを明示している。本発明のアンチセンスプロラミン遺伝子を導入したところ、予想通りプロラミン発現の低下したイネが作出された。なお、図中のモチ品種のバンドが他の品種と比較して薄くなっているのは、これらのデンプンが抽出操作中に著しく膨張して、タンパク質の回収効率を大きく低下させるためであり、含まれるタンパク質が少ないわけではない。

#### 【0259】

## (実施例 10：外来遺伝子の発現)

次に、外来遺伝子を導入した形質転換体を作製し、実際に外来遺伝子が効率よく発現されるかどうかを検証した。

## 【0260】

得られた LP13K およその原品種に、同じ発現カセットを導入して比較するやり方もできるが、本実施例では、これまで構築した発現カセットを生かし、図 8 に例示した発現ベクターを構築して通常品種に導入した。有用タンパク質のモデルとして蛍光タンパク質 GFP の発現を観察した。GFP はタンパク質の含量を、電気泳動と励起光をあてたときの発光強度の両方から評価することができる。発現ベクターの構築法としては、これまでの実験で用いてきたプロラミンアンチセンス遺伝子発現ベクター (pZH2B-LP13K) をベースに、その AscI 部位の部分に、別途 pUC198AA 上で構築しておいた 10KDa プロラミンプロモーターでドライブした GFP 発現カセットを AscI で切り出して連結した (pZH2B-GFP-LP13K)。また比較のための発現ベクターとして、pZH2B の AscI 部位の部分に GFP 発現カセットを AscI で切り出して連結した (pZH2B-GFP)。両者を日本晴に導入して、GFP 発現を比較したところ、pZH2B-GFP-LP13K を導入した場合には、pZH2B-GFP より明らかに GFP 発現量が増大していた。このように、本発明のプロラミンアンチセンス遺伝子またはそれを導入した組み換え低プロラミンイネは、外来有用タンパク質の効率的な発現システムとして、極めて有用であることが明示された。

## 【0261】

## (実施例 11：RNAi タイプ発現カセットを用いたアンチセンス)

次に、RNAi タイプ発現カセットを用いたアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体を作製し、どのようなアンチセンス構築物でも効率よく種子タンパク質発現が抑制されるかどうかを検証した。RNAi タイプ発現カセットを用いたアンチセンス遺伝子の構築は、基本的には、Nature 407:319-320 (2000) の方法に準じて行った。

## 【0262】

図1で示しておいたベクター（p Z H 2 B RNA i タイプ）に、本発明で使用するプロラミン遺伝子断片それぞれについて、X b a I または B g l I I I に1つ、S p e I または B a m H I に1つ、向きが逆になるように連結して、一連のRNA i タイプのプロラミンアンチセンス遺伝子発現ベクターを完成させた。これを、実施例2以降に示した方法でイネに導入して同様に解析した所、やはりプロラミン発現量は顕著に低下し、その抑制強度は、遺伝子断片1つを用いたアンチセンス遺伝子の場合よりも効果的であった。

### 【0263】

（実施例12：飲食品への応用）

本発明は飲食品への有用性も高い。それを実証するために、これまでの実施例で作出したイネの種子のなかから、L G - L P 1 3 K（L G C - 1 にプロラミンアンチセンス遺伝子を導入したもの）を用いて、日本酒の醸造試験を試みた。L G C - 1 は酒造用の米ではないが、一般食用品種でも日本酒製造は十分可能であり、L G C - 1 自体は醸造米としては、通常の品種と同等であることが確かめられている。

### 【0264】

日本酒醸造においては、原料米のタンパク質は、様々な雑味や好ましくないにおいのもとになるため、できるだけ低い方が望ましいとされている。粒の外側の糠層は油脂、ミネラル、タンパク質に極めて富んでおり、ここを削り落とす操作をとう精（あるいは精米）と呼ぶ。どのくらいとう精したかを示すのに、とう精前と後の重量比によるとう精歩合という指標が用いられるが、白米を炊飯して食する場合のとう精歩合は90%程度である。しかし、図6の電顕写真で分かる通り、白米表層細胞はタンパク質に富むため、日本酒醸造の場合はさらに表面を削ってとう精歩合70%以下のものを使うのが一般的であり、品評会用の最高級のものでは30%以下までというレベルで削り込みを行う。

### 【0265】

本発明の種子を用いると、原料のとう精歩合が高いままでも低タンパク質であり得るので、そのような過程を簡略化できる原料米として有用である。また洗米においても、もともとのタンパク質が少ないため、この過程も簡略化できる。タ

ンパク質が少ないほうが、デンプンの膨潤糊化が良いため、この部分でも利用するメリットがある。

#### 【0266】

精米過程を簡略化したLG-LP13Kと、通常のように精米したLGC-1で比較したところ、風味に顕著な差は見られなかったことから、本発明の低タンパク質植物は、食品産業においても有用性が示された。

#### 【0267】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

#### 【0268】

##### 【発明の効果】

本発明におけるプロラミンアンチセンス構築遺伝子により、種子中の総タンパク質含量が減少したイネおよびその種子が得られた。一義的な効果としては、栄養価に乏しいプロラミンが減少した分だけ、相対的にアミノ酸栄養価は高まり、タンパク源としての米の機能を強化し得る。また特に日本においては、低タンパク質な米が求められる場面が多いことから、一般食用、米加工品、日本酒醸造、腎臓病等アミノ酸摂取の絶対量が制限される疾病の治療食といった用途に有用である。さらには、外来有用タンパク質を効率的に発現できるバイオリクターとしても高いポテンシャルを持つ。このように、本発明は従来の技術では達成できなかった、多方面にインパクトをもたらす格別の成果である。

#### 【0269】

##### (配列表の説明)

配列番号1：13kDaプロラミン(RM9)の核酸配列

配列番号2：13kDaプロラミン(RM9)のアミノ酸配列

配列番号3：13kDaプロラミン(RM1)の核酸配列

配列番号4：13kDaプロラミン(RM1)のアミノ酸配列



- 配列番号 5～30: 代表的な 13 kDa プロラミンの配列
- 配列番号 31～32: 代表的な 16 kDa プロラミンの配列
- 配列番号 33～46: 代表的な 10 kDa プロラミンの配列
- 配列番号 47: イネ 10 kDa プロラミン遺伝子に由来するプロモーター配列
- 配列番号 48: イネグルテリン B1 遺伝子に由来するプロモーター配列
- 配列番号 49: CaMV 35S 遺伝子に由来するプロモーター配列
- 配列番号 50: 13 kDa プロラミンをコードする cDNA 全長 (配列番号 1) のアンチセンス
- 配列番号 51: 13 kDa プロラミンをコードする cDNA の N 末端の 67 bp のアンチセンス配列
- 配列番号 52: 13 kDa プロラミンをコードする cDNA の N 末端の 15 bp のアンチセンス配列
- 配列番号 53: ネガティブコントロール配列
- 配列番号 54: ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ
- 配列番号 55: Nos ターミネーター
- 配列番号 56: 改変遺伝子 mHP T アミノ酸配列
- 配列番号 57: CaMV 35S プロモーターおよび nos ターミネーターと制限酵素で切断されないように連結した選抜マーカー発現カセット
- 配列番号 58: mRub i P プロモーターの配列
- 配列番号 59: GUS 遺伝子断片
- 配列番号 60: 13 kDa プロラミンプロモーター配列
- 配列番号 61: 10 kDa プロラミンターミネーター配列
- 配列番号 62: グルテリン A3 プロモーター配列
- 配列番号 63～72: アンチセンスの他の例示配列
- 配列番号 73～84: アンチセンスの例示配列の対応アミノ酸配列
- 配列番号 85～88: プロラミンの特徴モチーフ
- 配列番号 89: RM4 アミノ酸配列
- 配列番号 90: RM5 アミノ酸配列
- 配列番号 91: RM7 アミノ酸配列

配列番号 9 2 : R M 1 0 アミノ酸配列

配列番号 9 3 : R M 1 6 アミノ酸配列

配列番号 9 4 : R M 4 核酸配列

配列番号 9 5 : R M 5 核酸配列

配列番号 9 6 : R M 7 核酸配列

配列番号 9 7 : イネアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子イントロン配列

【 0 2 7 0 】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> National Agricultural Research Organization

<120> Plant in which the protein content of the seed thereof is reduced  
and the method for producing and using same

<130> F1-02081405

<140> none

<141> none

<160> 96

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 617

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> Inventor: Kuroda, Masaharu

<220>

<223> 13kD prolamine RM9

<400> 1

gcaaaagcat aagaactaga aacccaccac aatgaagatc attttcttct ttgctctcct 60

tgctattgct gcatgcagtg cctctgcgca gtttgatgct gttactcaag ttacaggca 120

atatcagctg cagccgcac tcattgtgca gcaacagatg cttagcccat gcggtgagtt 180

cgtaaggcag cagtgcagca cagtggcaac ccccttcttc caatcacccg tgtttcaact 240

gagaaactgc caagtcattgc agcagcagtg ctgccaacag ctcaggatga tcgcacaaca 300

gtctcactgc caggccatta gcagtgttca ggctattgtg cagcagctac ggctacaaca 360

gtttgctagc gtctacttcg atcagagtca agctcaagcc caagctatgt tggccctaaa 420

catgccgtca atatgcggta tctaccaag ctacaacact gctccctgta gcattccac 480

cgtcggtggt atctggtatt gaattgtagc agtatagtag tacaggagag aaaaataaag 540

tcattcatca tcgtgtgtga caagttgaaa catcggggtg atacaaatct gaataaaaat 600

gtcatgcaag tttaaac

617

<210> 2

<211> 156

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine RM9

<400> 2

Met Lys Ile Ile Phe Phe Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ser

1

5

10

15

Ala Ser Ala Gln Phe Asp Ala Val Thr Gln Val Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Pro His Leu Met Leu Gln Gln Gln Met Leu Ser Pro Cys Gly

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Cys Ser Thr Val Ala Thr Pro Phe Phe Gln

50

55

60

Ser Pro Val Phe Gln Leu Arg Asn Cys Gln Val Met Gln Gln Gln Cys

65

70

75

80

Cys Gln Gln Leu Arg Met Ile Ala Gln Gln Ser His Cys Gln Ala Ile

85

90

95

Ser Ser Val Gln Ala Ile Val Gln Gln Leu Arg Leu Gln Gln Phe Ala

100

105

110

Ser Val Tyr Phe Asp Gln Ser Gln Ala Gln Ala Gln Ala Met Leu Ala

115

120

125

Leu Asn Met Pro Ser Ile Cys Gly Ile Tyr Pro Ser Tyr Asn Thr Ala

130

135

140

Pro Cys Ser Ile Pro Thr Val Gly Gly Ile Trp Tyr

145

150

155

<210> 3

<211> 601

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine RM1

<400> 3

aggaagcata gtagtagaat cctacaaaaa tgaagatcat tttcgtatTT gctctccttg 60

ctattgttgc atgcaacgct tctgcacggt ttgatgctct tagtcaaagt tatagacaat 120

atcaactaca atcgcatctc ctgctacagc aacaagtgct cagcccatgc agtgagttcg 180

taaggcaaca gcatagcata gtggcaaccc ctttctggca accagctacg tttcaattga 240

taaacaacca agtcatgcag caacagtgtt gccaacagct caggctggta gcgcaacaat 300

ctcactacca ggccattagt agcgttcagg cgattgtgca gcaactacag ctgcagcagg 360

tcggtgttgt ctactttgat cagactcaag ctcaagctca agctttgctg gccttaaact 420

tgccatccat atgtggtatc tatcctaact actacattgc tccgaggagc attcccaccg 480



ttggtggtgt ctggtactga attgtaatag tataatgggtt caaatgttaa aaataaagtc 540

atgcatcatc atgcgtgaca gttgaaactt gatgtcatat aaatctaaat aaactcgtgc 600

c 601

<210> 4

<211> 156

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine RM1

<400> 4

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Cys Asn

1

5

10

15

Ala Ser Ala Arg Phe Asp Ala Leu Ser Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser His Leu Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Cys Ser

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln His Ser Ile Val Ala Thr Pro Phe Trp Gln

50

55

60

Pro Ala Thr Phe Gln Leu Ile Asn Asn Gln Val Met Gln Gln Gln Cys

65

70

75

80

Cys Gln Gln Leu Arg Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Ala Ile

85

90

95

Ser Ser Val Gln Ala Ile Val Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Val Gly

100

105

110

Val Val Tyr Phe Asp Gln Thr Gln Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala

115

120

125

Leu Asn Leu Pro Ser Ile Cys Gly Ile Tyr Pro Asn Tyr Tyr Ile Ala

130

135

140

Pro Arg Ser Ile Pro Thr Val Gly Gly Val Trp Tyr

145

150

155

<210> 5

<211> 766

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 5

ttgcttcttc ccgtcctccc cgcttgggct cttgggcgcc cgttccgggc gccccctccc 60

tcctccctcc gcggtaccg gccgcctcac tcctctgctg gacccccggc cgccccgggc 120

cgcgcccat cccggtgcgc gacccatcgt tcacacagtt caagcattat acagaaaaat 180

agaaagatct agtgccccgc agcaatgaag atcattttcg tctttgctct ccttgctatt 240  
gctgcatgca ggcctctgcc gagtttgatg tttttaggtc aaagttatag gcaatatcag 300  
ctgcagtcgc ctgtcctgct acagcaacag gtgcttagcc catataatga gttcgtaagg 360  
cagcagtatg gcatagcggc aagccccctt ttgcaatcag ctgcatttca actgagaaat 420  
aaccaagtct ggcaacatca ggctggtggc caacaatctc gctatcagga cattaacatt 480  
gttcaggcca tagcgtagca gctacaactc cagcaatttg gtgatctcta ctttgatcgg 540  
aatcaggctc aagctcaagc tctattggct tttaacgtgc catctagata tggatatctac 600  
cctaggtact atggtgcacc cagtaccatt accacccttg gcggtgtctt gtaatgtgtt 660  
ttaacagtat agtggttcgg aagttaaaaa taagctcaga tatcatcata tgtgacatgt 720  
gaaactttgg gtgatataaa tagaaataaa gttgcctttc atattt 766

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 149

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 6

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Arg

1

5

10

15

Pro Leu Pro Ser Leu Met Phe Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln

50

55

60

Ser Ala Ala Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln His Gln Ala

65

70

75

80

Gly Gly Gln Gln Ser Arg Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala Ile

85

90

95

Ala Tyr Glu Leu Gln Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp Arg

100

105

110

Asn Gln Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Val Pro Ser Arg

115

120

125

Tyr Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr Thr

130

135

140

Leu Gly Gly Val Leu

145

<210> 7

<211> 717

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>



<223> 13kD prolamine

<400> 7

gttccgggcg cccccctccc tctccctcc gcggtacccg gccgcctcac tcctctgctg 60

gacccccggc cgccccgggc cgcgcccat cccggtgcgc gccccatcgt tcacacagtt 120

caagtattat acagaaaaat agaaagatct agtgtccgc agcaatgaag atcattttcg 180

tctttgctct ccttgctatt gctgcatgca gcgcctctgc gcagtttgat gttttaggac 240

aaagttatag gcaatatcag ctgcagtcgc ctgtcctgct acagcaacag gtgcttagcc 300

catataatga gttcgtaagg cagcagtatg gcatagcggc aagccccttc ttgcaatcag 360

ctgcatttca actgagaaac aaccaagtct ggcaacagct cgcgctgggtg gcgcaacaat 420

ctcactatca ggacattaac attgttcagg ccatagcgca gcagctacaa ctccagcagt 480

ttggatgatct ctactttgat cggaatctgg ctcaagctca gttggctttt aacgtgccat 540

ctagatatgg tatctaccct aggtactatg gtgcaccag taccattacc acccttggcg 600

gtgtcttgta atgtgtttta acaaggtata gtggttcgga agttaaaaat aagctcagat 660

atcatcatat gtagacatgtg aaactttggg tgatataaat agaaataaag ttgtctt 717

<210> 8

<211> 148

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 8

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ser

1

5

10

15

Ala Ser Ala Gln Phe Asp Val Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln

50

55

60

Ser Ala Ala Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln Gln Leu Ala

65

70

75

80

Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala

85

90

95

Ile Ala Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp

100

105

110

Arg Asn Leu Ala Gln Ala Gln Leu Ala Phe Asn Val Pro Ser Arg Tyr

115

120

125

Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr Thr Leu

130

135

140

Gly Gly Val Leu

145

&lt;210&gt; 9

<211> 650

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 9

cttccccgtc gggcccggcc ccggccctcg cctatccgcc tctcccccc gcgcccttca 60

ccactcccaa cccagctccc tttctccacc taccggcccc atcctttctca caactcaaac 120

attacagcga aagcataaca actagaatcc taccacaatg aagatcattt tcttctttgc 180

tctccttgct gaagctgcat gtagcgcctc tgcgcagttt gatgctgtta ctcaagttta 240

caggcaatat cagctgcagc aacagatgct tagcccatgc ggtgagttcg taaggcagca 300

gtgcagcaca gtggcaaccc ccttctttcca atcacccgtg tttcaactga gaaactgcca 360

agtcatgcag cagcagtgtt gccaacagct caggatgatc gcgcaacagt ctactgccca 420

ggccattagc agtggtcagg cgattgtgca gcagctacag ctacaacagt tttctggcgt 480

ctacttcgat caggctcaag ctcaagccca agctatgttg ggcctaaact tgccgtcaat 540

atgcggtatc tacccaagct acaacactgt ccctgagatt cctaccgtcg gtggtatctg 600

gtactgattg acgagataga gacagggaaa taagcatgat catcggggct 650

<210> 10

<211> 149

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 10

Met Lys Ile Ile Phe Phe Phe Ala Leu Leu Ala Glu Ala Ala Cys Ser

1

5

10

15

Ala Ser Ala Gln Phe Asp Ala Val Thr Gln Val Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Gln Gln Met Leu Ser Pro Cys Gly Glu Phe Val Arg Gln Gln

35

40

45

Cys Ser Thr Val Ala Thr Pro Phe Phe Gln Ser Pro Val Phe Gln Leu

50

55

60

Arg Asn Cys Gln Val Met Gln Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg Met

65

70

75

80

Ile Ala Gln Gln Ser His Cys Gln Ala Ile Ser Ser Val Gln Ala Ile

85

90

95

Val Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Phe Ser Gly Val Tyr Phe Asp Gln

100

105

110

Ala Gln Ala Gln Ala Gln Ala Met Leu Gly Leu Asn Leu Pro Ser Ile

115

120

125

Cys Gly Ile Tyr Pro Ser Tyr Asn Thr Val Pro Glu Ile Pro Thr Val

130

135

140



Gly Gly Ile Trp Tyr

145

<210> 11

<211> 629

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 11

cgttgaagca tagtagtaga atcctacaaa aatgaagatc attttcgtat ttgctctcct 60

tgctattggt gcatgcaacg cttctgcacg gtttgatgct cttagtcaaa gttatagaca 120  
atatcaacta caatcgcac tccagctaca gcaacaagtg ctcagcccat gcagtgaatt 180  
cgtaaggcaa cagcatagca tagtggcaac ccccttctgg caaccagcta cgtttcaatt 240  
gataaacaac caagtcacgc agcaacagtg ttgccaacag ctcaggctgg tagcgcaaca 300  
atctcactac caggccatta gtagcgttca ggcgattgtg cagcaactac agctgcagca 360  
ggtcggtggt gtctactttg atcagactca agctcaagct caagctttgc tggccttaaa 420  
cttgccatcc atatgtggtg tctatcctaa ctactacatt gctccgagga gcattcccac 480  
cgttgggtgtg tctgggtactg aattgtaata gtataatggt tcaaatgtta aaaataaagt 540  
catgcatcat catgcgtgac agttgaaact tgatgtcata taaatctaaa taaaatcacc 600  
tatttaata gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 629

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 158

&lt;212&gt; PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 12

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Cys Asn

1

5

10

15

Ala Ser Ala Arg Phe Asp Ala Leu Ser Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser His Leu Gln Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Cys Ser

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln His Ser Ile Val Ala Thr Pro Phe Trp Gln

50

55

60

Pro Ala Thr Phe Gln Leu Ile Asn Asn Gln Val Met Gln Gln Gln Cys

65

70

75

80

Cys Gln Gln Leu Arg Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Ala Ile

85

90

95

Ser Ser Val Gln Ala Ile Val Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Val Gly

100

105

110

Val Val Tyr Phe Asp Gln Thr Gln Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala

115

120

125

Leu Asn Leu Pro Ser Ile Cys Gly Ile Tyr Pro Asn Tyr Tyr Ile Ala

130

135

140

Pro Arg Ser Ile Pro Thr Val Gly Val Ser Gly Thr Glu Leu

145

150

155

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 603

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;220&gt;

<223> 13kD prolamine

<400> 13

gaagcatagt agtagaatcc aacaacaatg aagatcatTT tcgtatttgc tctccttgct 60

attgttgcat gcaatcgctc tgcgcggttt gatcctctta gtcaaagtta taggcaatat 120

caactacagt cgcattcctt actacagcaa caagtgtca gcccatgcag tgagtctgta 180

aggcaacagt atagcatagt ggcaaccccc ttctggcaac cagctacgtt tcaattgata 240

aacaaccaag tcatgcagca gcagtgttgc caacagctca ggctggtagc acaacaattt 300

cactaccagg ccattagtat tgttcaagcg attgtgcaac agctacaact gcagcaattt 360

agtgggtgtct actttgatca gactcaagct caagcccaaa ctctgttgac cttcaacttg 420

ccatccatat gtggtatcta ccctaactac tatagtgtc ccaggagcat tgccactgtt 480

ggtgggtgtct ggtactgaat tgtaacaata taatagttcg tatgttaaaa ataaagtcatt 540

acatcatcat gtgtgactgt tgaaacttag ggtcatataa atctaaataa aatcatctta 600

cct

603

<210> 14

<211> 156

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 14

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Cys Asn

1

5

10

15

Arg Ser Ala Arg Phe Asp Pro Leu Ser Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser His Leu Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Cys Ser

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Ser Ile Val Ala Thr Pro Phe Trp Gln

50

55

60

Pro Ala Thr Phe Gln Leu Ile Asn Asn Gln Val Met Gln Gln Gln Cys

65

70

75

80

Cys Gln Gln Leu Arg Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Ala Ile

85

90

95

Ser Ile Val Gln Ala Ile Val Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Phe Ser



100

105

110

Gly Val Tyr Phe Asp Gln Thr Gln Ala Gln Ala Gln Thr Leu Leu Thr

115

120

125

Phe Asn Leu Pro Ser Ile Cys Gly Ile Tyr Pro Asn Tyr Tyr Ser Ala

130

135

140

Pro Arg Ser Ile Ala Thr Val Gly Gly Val Trp Tyr

145

150

155

<210> 15

<211> 601

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 15

attatacaac aaaaatttaa aagaactagt gtcctgcaac aatgaagatc attttcgtct 60  
ttgctctcct tgctattgct gcatgcagcg cactgcgca gtttgatgtt ttaggtcaaa 120  
atattaggca atatcaggtg cagtcgcctc tcctgctaca gcaacaggtg cttagcccat 180  
ataatgagtt cgtaaggcag cagtatagca ttgcggcaag caccttcttg caatcagctg 240  
cgtttcaact gagaaacaac caagtcttgc aacagctcag gctggtggcg caacaatctc 300  
actaccagga cattaacgtt gtccaggcca tagcgacca gctacacctc cagcagtttg 360  
gcaatctcta cattgaccgg aatctggctc aagctcaagc actgttggct ttaacttgc 420  
catctacata tggatatctac ctttggctct atagtgcacc cgatagcatt accacccttg 480

gcggtgtctt gtactgaatt ttcacaatat tgtagttcgg aagtgaaaat ataagctcag 540

gtatcatcgt atgtgacatg tgaaacttga ggtgatataa atagaaataa aattatcttt 600

c

601

<210> 16

<211> 151

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 16

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ser

1

5

10

15

Ala Thr Ala Gln Phe Asp Val Leu Gly Gln Asn Ile Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Val Gln Ser Pro Leu Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Ser Ile Ala Ala Ser Thr Phe Leu Gln

50

55

60

Ser Ala Ala Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Leu Gln Gln Leu Arg

65

70

75

80

Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Asp Ile Asn Val Val Gln Ala

85

90

95

Ile Ala His Gln Leu His Leu Gln Gln Phe Gly Asn Leu Tyr Ile Asp

100

105

110

Arg Asn Leu Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Leu Pro Ser

115

120

125

Thr Tyr Gly Ile Tyr Pro Trp Ser Tyr Ser Ala Pro Asp Ser Ile Thr

130

135

140

Thr Leu Gly Gly Val Leu Tyr

145

150

<210> 17

<211> 596

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 17

gcaaaataga aagatctagt gtcccgagc aatgaagatc attttcgtct ttgctctcct 60

tgctattgct gcatgcagcg cctctgcgca gtttgatgtt ttaggtcaaa gttataggca 120

atatcagctg cagtcgcctg tcctgctaca gcaacagggtg cttagcccat ataatgagtt 180

cgtaaggcag cagtatggca tagcggcaag ccccttcttg caatcagctg cgtttcaact 240

gagaaacaac caagtctggc aacagctcgc gctggtggcg caacaatctc actatcagga 300  
cattaacatt gttcaggcca tagcgagca gctacaactc cagcagtttg gtgatctcta 360  
ctttgatcgg aatctggctc aagctcaagc tctgttggct tttaacgtgc catctagata 420  
tggtatctac cctaggtact atggtgcacc cagtaccatt accacccttg gcggtgtctt 480  
gtaatgagtt ttaacagtat agtggttcgg aagttaaaaa taagctcaga tatcatatat 540  
gtgacatgtg aaactttggg tgatataaat agaaaaaag ttgtctttca tattta 596

<210> 18

<211> 150

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 18

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ser

1

5

10

15

Ala Ser Ala Gln Phe Asp Val Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln

50

55

60



Ser Ala Ala Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln Gln Leu Ala

65

70

75

80

Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala

85

90

95

Ile Ala Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp

100

105

110

Arg Asn Leu Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Val Pro Ser

115

120

125

Arg Tyr Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr

130

135

140

Thr Leu Gly Gly Val Leu

145

150

<210> 19

<211> 616

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 19

cagttcaagc attatacagc aaaatagaaa gatctagtgt cccgcagcaa tgaagatcat 60

tttcgtcttt gctctccttg ctattgctgc atgcagcgcc tctcgagtt tgattttagg 120  
tcaaagttat aggcaatatc agctgcagtc gcctgtcctg ctacagcaac aggtgcttag 180  
cccatataat gagttcgtaa gcagcagtat ggcatacggc aacccttct tgcaatcagc 240  
tgcgtttcaa ctgagaaaca accaagtctg gcaacagctc gcgctggtgg cgcaacaatc 300  
tcactatcag gacattaaca ttgttcaggc catagcgag cagctacaac tccagcagtt 360  
tggatgatctc tactttgatc ggaatctggc tcaagctcaa gctctgttgg cttttaacgt 420  
gccacataa tatggtatct accctaggta ctatggtgca ccagttacca ttaccaccct 480  
tggcgggtgc ttgtaatgaa tttaacagta taatggctcg aagttaaaaa taagctcaga 540  
taccctcata tgtgacatgt gaaactttgg gtgatataaa taaaaaaaa attgtctttc 600  
ctatttaaaa aaaaaa 616

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 148

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 20

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ser

1

5

10

15

Ala Ser Arg Ser Leu Ile Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln Leu

20

25

30

Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn Glu

35

40

45

Phe Val Ser Ser Ser Met Ala Tyr Gly Asn Pro Phe Leu Gln Ser Ala

50

55

60

Ala Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln Gln Leu Ala Leu Val

65

70

75

80

Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala Ile Ala

85

90

95

Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp Arg Asn

100

105

110

Leu Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Val Pro Pro Lys Tyr

115

120

125

Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr Thr Leu

130

135

140

Gly Gly Val Leu

145

<210> 21

<211> 769

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 21

ttgctccttc nccgtcctcc ccgcttgggc tcttgggcgc ccgttccggg cgccccctcc 60  
ctcctccctc cgcgggtaccc ggccgcctca ctcctctgct ggacccccng gccgccccgg 120  
gccgcgcccc atcccgggtgc gcgacccatc gttcacacag ttcaagcatt atacagaaaa 180  
atagaaagat ctagtgtccc gcagcanatg aagatcattt tcgtctttgc tctccttgct 240  
attgctgcat gcaggcctct gccgagtttg atgttttttag gtcaaagtta taggcaatat 300  
cagctgcagt cgcctgtcct gctacagcaa caggtgctta gcccatataa tgagttcgta 360  
aggcagcagt atggcatagc ggcaagcccc ttcttgcaat cagctgcatt tcaactgaga 420  
aataaccaag tctggcaaca tcaggctggt ggccaacaat ctgctatca ggacattaac 480  
attgttcagg ccatagcgta cgagctacaa ctccagcaat ttggtgatct ctactttgat 540  
cggaatcagg ctcaagctca agctctattg gcttttaacg tgccatctag atatggtatc 600  
taccctaggt actatggtgc acccagtacc attaccaccc ttggcggtgt cttgtaatgt 660

gtttaacag tatagtgggtt cggaagttaa aaataagctc agatatcatc atatgtgaca 720

tgtgaaactt tgggtgatat aaatagaaat aaagttgcct ttcataattt 769

<210> 22

<211> 149

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 22

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Arg

1

5

10

15



Pro Leu Pro Ser Leu Met Phe Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln

50

55

60

Ser Ala Ala Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln His Gln Ala

65

70

75

80

Gly Gly Gln Gln Ser Arg Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala Ile

85

90

95

Ala Tyr Glu Leu Gln Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp Arg

100

105

110

Asn Gln Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Val Pro Ser Arg

115

120

125

Tyr Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr Thr

130

135

140

Leu Gly Gly Val Leu

145

<210> 23

<211> 609

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 23

aagcattata caacaaaaat ttaaaagaac tagtgcctg caacaatgaa gatcattttc 60

gtctttgctc tccttgctat tgctgcatgc gccacagcgc agtttgatgt tttaggtcaa 120

aatattaggc aatatcaggt gcagtcgcct ctctgctac agcaacaggt gcttagccta 180

tataatgagt tcgtaaggca gcagtatagc attgcggcaa gccccttctt gcaatcagct 240

gtgtttcaac tgagaaacaa ccaagtcttg caacagctca ggctggtggc gcaacaatct 300

cactaccagg acattaacgt tgtccaggcc atagcgagc agctacacct ccagcagttt 360

ggcgatctct acattgaccg gaatctggct caagcgcaac gactgttggc ttttaacttg 420

ccatctacat atggatatcta ccctaggtac tatagagcac cgggtagtat taccaccctt 480

ggcgggtgtct tgtactgaat tttcacaata ttgtagttcg gaagtgaaaa tataagcctc 540

aggtatcatc gtatgtgaca tgtgaaactt aaggtgatat aaatagaaat aaaattatct 600

ttcatatatt

609

<210> 24

<211> 150

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

&lt;400&gt; 24

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ala

1

5

10

15

Thr Ala Gln Phe Asp Val Leu Gly Gln Asn Ile Arg Gln Tyr Gln Val

20

25

30

Gln Ser Pro Leu Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Leu Tyr Asn Glu

35

40

45

Phe Val Arg Gln Gln Tyr Ser Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln Ser

50

55

60

Ala Val Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Leu Gln Gln Leu Arg Leu

65

70

75

80

Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Asp Ile Asn Val Val Gln Ala Ile

85

90

95

Ala Gln Gln Leu His Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Ile Asp Arg

100

105

110

Asn Leu Ala Gln Ala Gln Arg Leu Leu Ala Phe Asn Leu Pro Ser Thr

115

120

125

Tyr Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro Gly Ser Ile Thr Thr

130

135

140

Leu Gly Gly Val Leu Tyr

145

150

<210> 25

<211> 596

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 25

ccagcaaaat agaaagatct agtgtcccg c agcaatgaag atcattttcg tctttgctct 60

ccttgctatt gctgcatgca ggcctctgca gtttgatggt ttaggtcaaa gttataggca 120  
atatcagctg cagtcgcctg tcctgctaca gcaacatgtg cttagcccat ataatgagtt 180  
cgtaaggcag cagtatggca tagcggcaag ccccttcttg caatcagctg cgtttcaact 240  
gagaaacaac caagtctggc aacagctcgc gctgggtggcg caacaatctc actatcagga 300  
cattaacatt gttcaggcca tagcgcagca gctacaactc cagcagtttg gtgatctcta 360  
ctttgatcgg aatctggctc aagctcaagc tctgttggct tttaacgtgc catctagata 420  
tggtatctac cctaggtact atgggtgcacc cagtaccatt accacccttg gcggtgtctt 480  
gtaatgagtt ttaacagtat agtgggttcgg aagataaaaa taagctcaga tatcatcata 540  
tgtgacatgt gaaactttgg gtgatataaa tagaaaaaaa gttgtctttc atattt 596

<210> 26

<211> 149

<212> PRT

<213> Oryza sativa



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 13kD prolamine

&lt;400&gt; 26

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Arg

1

5

10

15

Pro Leu Gln Phe Asp Val Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln Leu

20

25

30

Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln His Val Leu Ser Pro Tyr Asn Glu

35

40

45

Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln Ser

50

55

60

Ala Ala Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln Gln Leu Ala Leu

65

70

75

80

Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala Ile

85

90

95

Ala Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp Arg

100

105

110

Asn Leu Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Val Pro Ser Arg

115

120

125

Tyr Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr Thr

130

135

140

Leu Gly Gly Val Leu

145

<210> 27

<211> 285

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 27

gttcgtaagg caacagtata gcatagtggc aacccccttc tggcaaccag ctacgtttca 60

tttgataaac aaccaagtca tgcagcagca gttttgcaa cagctcaggc tggtagcaca 120

acattctcac taccaggcca ttagtattgt tcaagcgatt gtgcaacagc tacaactgca 180

gcattttagt ggtgtctact ttgatcagac tcaagctcaa gcccaaactt ttttgacctt 240

caactttccc atccatatgt ggtatctacc ttaacttact attgt 285

<210> 28

<211> 94

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

<400> 28

Phe Val Arg Gln Gln Tyr Ser Ile Val Ala Thr Pro Phe Trp Gln Pro

1

5

10

15

Ala Thr Phe His Leu Ile Asn Asn Gln Val Met Gln Gln Gln Phe Cys

20

25

30

Gln Gln Leu Arg Leu Val Ala Gln His Ser His Tyr Gln Ala Ile Ser

35

40

45

Ile Val Gln Ala Ile Val Gln Gln Leu Gln Leu Gln His Phe Ser Gly

50

55

60

Val Tyr Phe Asp Gln Thr Gln Ala Gln Ala Gln Thr Phe Leu Thr Phe

65

70

75

80

Asn Phe Pro Ser Ile Cys Gly Ile Tyr Leu Asn Leu Leu Leu

85

90

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 1836

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 13kD prolamine

<400> 29

tccacatggg acggggccaa ggtgaggaaa gcaagctgca caaaggatta aagttcttgt 60

aaacttgaaa ctcaatttga gtgtttatcc tagctaatat gatcccttca tcctagaata 120

taacaatcta gaattagatg tgctatctaa acacattgta gtaggtaatg tgatcatctaa 180

tcttagatat aatctaaaac ggaaggtgaa acggagggag tacctacata gtaatggcat 240

gcctatgttg cttaatttga cccgtgcagc tgagtatatg tgatggagac aaaagttact 300

ttcatgatgg caccaaagga gatttgttgg ggtgcctaata agaacatcga tccaaatgac 360

acgacacact tagatttctaa taggacatcc aagcaaaaaca acacttagat cctaataagga 420

catccaagca aaactaacac tctagagcaa ccgataagga attgaaaaag tttgtccatc 480

attcttgaca agaggtagtg tacaaaaaaa atatittagtt gagctctcgc tcactacgca 540

tcacagaagt ataacctaga tataattaat tcagtataga agcaaaaatt cagcagcaac 600

aatgagggtta aaaactagaa agaaggattt atgatgttcc tcagtttatt cagtcgcaaa 660

agatagttta ctgtaaaca aatggataat aaacctgatg tttcaacaaa actagaggaa 720

ctctgtaaat tgtccagggt catccctaga agttggtttc tccttacggg aggagggagt 780  
atatgtgatg gacacaaaag ttactttcat gatgaaacca aagggtatit gttggggcac 840  
ctaacagaac atctatctaa atgacatgac tcacttagat cctaatagga catccaagca 900  
aaactaacac tctaaagcaa ccgatgagga attgaaagaa aatatatgcc atcgcatcta 960  
taaatagaca agcccaatga aaaccctcct catcgtttac acagttcaag cattatacag 1020  
aaaagaagat ctagtgtccc gcagcaatga agatcatttt ccgtctttgc tctccttgct 1080  
attgctgcat gcaacacctc tgcgtagttg atgttttagg tcaaagttat aggcaatatc 1140  
agctacagtc gcctctccta caacaacaac aggtgcttag cccatataat gacttcgtaa 1200  
ggcagcgata tggcatagcg gcaagcccct tcttgcaatc agctgcgttt aaactgagaa 1260  
ataaccaagt ctggcaacag ctcgggctgg tggcgcaaca atctcactat caggacatta 1320  
acattgttca ggccatagcg cagcagctat aactccagca gtttggatgat ctctactttg 1380  
atcggaatcc ggctcaagct caagctctgt tggcttttaa cgtgccatct agatatggta 1440  
tctaccctag gtactatagt acaccagta ccattaccac ccttggcggg gtcttgtaat 1500  
gagttttaac agtatagtgg ttcggaagtt aaaaataagc tcatatatta tcatatgtga 1560  
catgtgaaat ttggggtgaa ataaatcgaa ataaagtigt ctttcatatt taaataccat 1620



gcctctataa ggatatatcc tagtacattg tcgtaactaa ttaccatcat cgg tactcta 1680

caattttact gtgttcttac attcgatccg aagctacttt gttttaaga tataaatgga 1740

gcgtataaag gatgtccgtc ctttcattcc aataagaaca atgtaacatc ctgaaaatgt 1800

gtcattttct aatcctgcat catgccgact cttatg 1836

<210> 30

<211> 101

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 13kD prolamine

&lt;400&gt; 30

Met Lys Ile Ile Phe Arg Leu Cys Ser Pro Cys Tyr Cys Cys Met Gln

1

5

10

15

His Leu Cys Val Val Asp Val Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser Pro Leu Leu Gln Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn

35

40

45

Asp Phe Val Arg Gln Arg Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln

50

55

60

Ser Ala Ala Phe Lys Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln Gln Leu Gly

65

70

75

80

Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala

85

90

95

Ile Ala Gln Gln Leu

100

<210> 31

<211> 622

<212> DNA

<213> rice

<220>

<223> 16kD prolamine

<400> 31

aaacatcaaa acgttataag agttctctag catccatcac atagccatga agatctttgt 60

catcctctct ctctcgccc tcgcagcgag cagcgcctcg gcacagtttg atgcttgcac 120

ctatgggcaa tgccagcagc agccgtttat gcaaccgac atgaaccgt gcaatgagtt 180

cgtgaggcaa cagtgcagcc cgatgagcct accttgaag cagtcacgca ggctacaact 240

gagcagctgc caggtgatgc ggcagcaatg ctgtcagcag atgaggttga tggcgcaaca 300

atatcattgc caggctatct gcaccatggt gcagtctatc atgcagcaag tgcagtttga 360

tgctggcttt gttggcgagc cccaagctca ggcccaggcc caggtggctc tcaatttgcc 420

ctccatgtgt ggagtctacc ctaggtactg cagcactcca tgcaaagttg ctactggtca 480

ttgcggttct tggtagtgtg taccatcata tatatatagt tggataaata aagtgtcaca 540

catcatcgtg tgtgtcatgt aataaaattt ggaatagtct ttggctgttc gtatgaataa 600

atgaaaatta taacaaaaaa aa

622

<210> 32

<211> 149

<212> PRT

<213> rice

<220>

<223> 16kD prolamine

<400> 32

Met Lys Ile Phe Val Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Ser Ala Gln Phe Asp Ala Cys Thr Tyr Gly Gln Cys Gln Gln Gln

20

25

30

Pro Phe Met Gln Pro Ile Met Asn Pro Cys Asn Glu Phe Val Arg Gln

35

40

45

Gln Cys Ser Pro Met Ser Leu Pro Trp Lys Gln Ser Arg Arg Leu Gln

50

55

60

Leu Ser Ser Cys Gln Val Met Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Met Arg

65

70

75

80

Leu Met Ala Gln Gln Tyr His Cys Gln Ala Ile Cys Thr Met Val Gln

85

90

95

Ser Ile Met Gln Gln Val Gln Phe Asp Ala Gly Phe Val Gly Glu Pro

100

105 .

110

Gln Ala Gln Ala Gln Ala Gln Val Ala Leu Asn Leu Pro Ser Met Cys

115

120

125

Gly Val Tyr Pro Arg Tyr Cys Ser Thr Pro Cys Lys Val Ala Thr Gly

130

135

140

His Cys Gly Ser Trp

145

<210> 33

<211> 562

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 33

cgtctacacc atctggaatc ttgtttaaca ctagtattgt agaatcagca atggcagcat 60

acaccagcaa gatctttgcc ctgtttgcct taattgctct ttctgcaagt gccactactg 120

caatcaccac tatgcagtat ttcccaccaa cattagccat gggcaccatg gatccgtgta 180

ggcagtacat gatgcaaacg ttgggcatgg gtagctccac agccatgttc atgtcgcagc 240

caatggcgct cctgcagcag caatgttgca tgcagctaca aggcattgat cctcagtgcc 300

actgtggcac cagttgccag atgatgcaga gcatgcaaca agttatttgt gctggactcg 360

ggcagcagca gatgatgaag atggcgatgc agatgccata catgtgcaac atggcccctg 420

tcaacttcca actctcttcc tgttggtgtt gttgatcaaa cgttggttac atgtactcta 480



gtaataaggt gttgcatact atcgtgtgca aacactagaa ataagaacca ttgaataaaa 540

tatcaatcat tttcagactt gc

562

<210> 34

<211> 134

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 34

Met Ala Ala Tyr Thr Ser Lys Ile Phe Ala Leu Phe Ala Leu Ile Ala

1

5

10

15

Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile Thr Thr Met Gln Tyr Phe Pro

20

25

30

Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp Pro Cys Arg Gln Tyr Met Met

35

40

45

Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr Ala Met Phe Met Ser Gln Pro

50

55

60

Met Ala Leu Leu Gln Gln Gln Cys Cys Met Gln Leu Gln Gly Met Met

65

70

75

80

Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys Gln Met Met Gln Ser Met Gln

85

90

95

Gln Val Ile Cys Ala Gly Leu Gly Gln Gln Gln Met Met Lys Met Ala

100

105

110

Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn Met Ala Pro Val Asn Phe Gln Leu

115

120

125

Ser Ser Cys Gly Cys Cys

130

<210> 35

<211> 332

<212> DNA

<213> *Oryza rufipogon*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 35

aattgctctt tctgcaagtg ccactactgc aatcaccact atgcagtatt tcccaccaac 60

attagccatg ggcacccatgg atccgtgtag gcagtlacatg atgcaaactg tgggcatggg 120

tagctccaca gccatgttca tgtcgcagcc aatggcgctc ctgcagcagc aatgttgcat 180

gcagctacaa ggcattgatgc ctcatgtcca ctgtggcacc agttgccaga tgatgcagag 240

catgcaacaa gttattttgtg ctggactcgg gcagcagcag atgatgaaga tggcgatgca 300

gatgccatac atgtgcaaca tggcccctgt ca

332

<210> 36

<211> 110

<212> PRT

<213> *Oryza rufipogon*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 36

Ile Ala Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile Thr Thr Met Gln Tyr

1

5

10

15

Phe Pro Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp Pro Cys Arg Gln Tyr

20

25

30

Met Met Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr Ala Met Phe Met Ser

35

40

45

Gln Pro Met Ala Leu Leu Gln Gln Gln Cys Cys Met Gln Leu Gln Gly

50

55

60

Met Met Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys Gln Met Met Gln Ser

65

70

75

80

Met Gln Gln Val Ile Cys Ala Gly Leu Gly Gln Gln Gln Met Met Lys

85

90

95

Met Ala Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn Met Ala Pro Val

100

105

110

<210> 37

<211> 349

<212> DNA

<213> *Oryza longistaminata*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 37

ccctgtttgc cttaattnnt cttctttctg caagtgccac tactgcaatc actactatgc 60

agtattttccc accaacatta gccatgggca ccatggatcc gtgtaggcag tacatgatgc 120

aaacgttggg catgggtagc tccacaacca tgttcatgtc gcagccaatg gcgctcctgc 180

agcagcaatg ttgcatgcag ctacaaggca tgatgcctca gtgccactgt ggcaccagtt 240

gccagatgat gcagagcatg caacaagttg tttgtgctgg actcgggcag cagcagatga 300

tgatgaagat ggcaatgcag atgccataca tgtgcaacat ggcccctgt 349

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> *Oryza longistaminata*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 38

Leu Phe Ala Leu Ile Xaa Leu Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile



1

5

10

15

Thr Thr Met Gln Tyr Phe Pro Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp

20

25

30

Pro Cys Arg Gln Tyr Met Met Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr

35

40

45

Thr Met Phe Met Ser Gln Pro Met Ala Leu Leu Gln Gln Gln Cys Cys

50

55

60

Met Gln Leu Gln Gly Met Met Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys

65

70

75

80

Gln Met Met Gln Ser Met Gln Gln Val Val Cys Ala Gly Leu Gly Gln

85

90

95

Gln Gln Met Met Met Lys Met Ala Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn

100

105

110

Met Ala Pro Val

115

<210> 39

<211> 343

<212> DNA

<213> *Oryza rufipogon*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 10kD prolamine

&lt;400&gt; 39

ctgtttgcct taattgctct ttctgcaagt gccactactg caatcaccac tatgcagtat 60  
ttcccaccaa cattagccat gggcaccatg gatccgtgta ggcagtacat gatgcaaacg 120  
ttgggcatgg gtagctccac agccatgttc atgtcgcagc caatggcgct cctgcagcag 180  
caatgttgca tgcagctaca aggcgatgatg cctcagtgcc actgtggcac cagttgccag 240  
atgatgcaga gcatgcaaca agttatttgt gctggactcg ggcagcagca gatgatgaag 300  
atggcgatgc agatgccata catgtgcaac atggcccctg tca 343

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 113

<212> PRT

<213> *Oryza rufipogon*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 40

Leu Phe Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile Thr

1

5

10

15

Thr Met Gln Tyr Phe Pro Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp Pro

20

25

30

Cys Arg Gln Tyr Met Met Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr Ala

35

40

45

Met Phe Met Ser Gln Pro Met Ala Leu Leu Gln Gln Gln Cys Cys Met

50

55

60

Gln Leu Gln Gly Met Met Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys Gln

65

70

75

80

Met Met Gln Ser Met Gln Gln Val Ile Cys Ala Gly Leu Gly Gln Gln

85

90

95

Gln Met Met Lys Met Ala Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn Met Ala

100

105

110

Pro

<210> 41

<211> 339

<212> DNA

<213> *Oryza rufipogon*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 41

tttgccttaa ttgctctttc tgcaagtgcc actactgcaa tcaccactat gcagtatttc 60

ccaccaacat tagccatggg caccatggat ccgtgtaggc agtacatgat gcaaacgttg 120

ggcatgggta gctccacagc catgttcatg tcgcagccaa tggcgctcct gcagcagcaa 180

tgttgcatgc agctacaagg catgatgcct cagtgccact gtggcaccag ttgccagatg 240

atgcagagca tgcaacaagt tatttgtgct ggactcgggc agcagcagat gatgaagatg 300

gcgatgcaga tgccatacat gtgcaacatg gcccctgtc 339

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 42

Phe Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile Thr Thr

1                      5                      10                      15

Met Gln Tyr Phe Pro Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp Pro Cys

20                      25                      30

Arg Gln Tyr Met Met Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr Ala Met

35                      40                      45

Phe Met Ser Gln Pro Met Ala Leu Leu Gln Gln Gln Cys Cys Met Gln

50                      55                      60

Leu Gln Gly Met Met Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys Gln Met

65                      70                      75                      80



Met Gln Ser Met Gln Gln Val Ile Cys Ala Gly Leu Gly Gln Gln Gln

85

90

95

Met Met Lys Met Ala Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn Met Ala Pro

100

105

110

Val

<210> 43

<211> 343

<212> DNA

<213> *Oryza rufipogon*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 10kD prolamine

&lt;400&gt; 43

ccctgtttgc ctttaattgnt ctttctgcaa gtgccactac tgcaatcacc actatgcagt 60  
atttcccacc aacattagcc atgggcacca tggatccgtg taggcagtac atgatgcaaa 120  
cgttgggcat gggtagctcc acagccatgt tcatgtcgca gccaatggcg ctcctgcagc 180  
agcaatgttg catgcagcta caaggcatga tgcctcagtg ccactgtggc accagttgcc 240  
agatgatgca gagcatgcaa caagttatit gtgctggact cgggcagcag cagatgatga 300  
agatggcgat gcagatgcca tacatgtgca acatggcccc tgt 343

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 114

<212> PRT

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 44

Leu Phe Ala Leu Ile Xaa Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile Thr

1

5

10

15

Thr Met Gln Tyr Phe Pro Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp Pro

20

25

30

Cys Arg Gln Tyr Met Met Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr Ala

35

40

45

Met Phe Met Ser Gln Pro Met Ala Leu Leu Gln Gln Gln Cys Cys Met

50

55

60

Gln Leu Gln Gly Met Met Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys Gln

65

70

75

80

Met Met Gln Ser Met Gln Gln Val Ile Cys Ala Gly Leu Gly Gln Gln

85

90

95

Gln Met Met Lys Met Ala Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn Met Ala

100

105

110

Pro Val

<210> 45

<211> 533

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 45

atggcagcat acaccagcaa gatctttgcc ctgtttgcct taattgctct ttctgcaagt 60

gccactactg caatcaccac tatgcagtat ttcccaccaa cattagccat gggcaccatg 120

gatccgtgta ggcagtacat gatgcaaacg ttgggcatgg gtagctccac agccatgttc 180  
atgtcgcagc caatggcgct cctgctgcag caatgttgca tgcagctaca aggcgatgatg 240  
cctcagtgcc actgtggcac cagttgccag atgatgcaga gcatgcaaca agttatttgt 300  
gctggactcg ggcagcagca gatgatgaag atggcgatgc agatgccata catgtgcaac 360  
atggcccctg tcaacttcca actctcttcc tgtggttggt gttgatgaaa cgttggttac 420  
atgtactcta gtaataaggt gttgcatact atcgtgtgca aacactagaa ataagtacca 480  
ttgaataaaa tatcaaacat tttcagactt gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 533

<210> 46

<211> 134

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 10kD prolamine

<400> 46

Met Ala Ala Tyr Thr Ser Lys Ile Phe Ala Leu Phe Ala Leu Ile Ala

1

5

10

15

Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile Thr Thr Met Gln Tyr Phe Pro

20

25

30

Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp Pro Cys Arg Gln Tyr Met Met

35

40

45

Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr Ala Met Phe Met Ser Gln Pro

50

55

60

Met Ala Leu Leu Leu Gln Gln Cys Cys Met Gln Leu Gln Gly Met Met

65

70

75

80

Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys Gln Met Met Gln Ser Met Gln

85

90

95

Gln Val Ile Cys Ala Gly Leu Gly Gln Gln Gln Met Met Lys Met Ala

100

105

110

Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn Met Ala Pro Val Asn Phe Gln Leu

115

120

125

Ser Ser Cys Gly Cys Cys

130



<210> 47

<211> 940

<212> DNA

<213> rice

<220>

<223> 10kDa prolamine promoter

<400> 47

aatttagatc tatacatccg ttggtacatc tctactactc tagtactaaa aacatgagat 60

ctgaacatgg ctgcataggt tctccatccc aattcaccct gcagtgatcg ctgcactgga 120

taattataat atcagttaaa attgaaaata atgcaacttc atacttgcac ggtgtcagta 180

gtgcctgcct aagaaatgtg tcttgtcata atatgattac atgaaatatg tttacttcct 240  
tcgtttctct ttatttgtaa gataaagaac tagatatgtg gaaagtagga tagcaaagag 300  
tatggccaaa ctctaacttt tgctttatit tttgggatgg acccaaaatt tgtttctcct 360  
ttacttcttt cccittacaa caatgttctt tacttccaat tcttattaac aaaactccaa 420  
atacatgcca aactgcatat gtatgtatgc tattaaggca catttacaaa gctccaagtt 480  
tacctactca atcattcaca tatggcgatg actcaaactc ttaattgtta tctgtgtaag 540  
ctgtgacttg tgtaacacat tctacaagtc ccatacgaat tctgttcaca aaagtttctt 600  
tgtccagctc ataatttaca aaactgcaaa atgccaaagc aatctggcac aaccttatca 660  
tcatattttc ttccacgca ttaaagcact ggcagaatta tctttgtgta gatattccaa 720  
aagtattggt tgaataaatg tccaaataaa ttccatgcct catgatttcc agcttatgtg 780  
gcctccacta ggtggttttg caaaggccaa actctttcct ggcttacaca gctaccagca 840  
tgtataaata ggcccctagg caaccattat tccatcatcc tcaacaatat tgtctacacc 900  
atctggaatc ttgtttaaca ctagtattgt agaatcagca 940

<210> 48

<211> 1351

<212> DNA

<213> rice

<220>

<223> GLUTELIN-B1 promoter

<400> 48

gatctcgatt tttgaggaat tttagaagtt gaacagagtc aatcgaacag acagttgaag 60

agatatggat tttctaagat taattgattc tctgtctaaa gaaaaaaagt attattgaat 120

taaatggaaa aagaaaaagg aaaaagggga tggcttctgc tttttgggct gaaggcggcg 180

tgtggccagc gtgctgcgtg cggacagcga gcgaacacac gacggagcag ctacgacgaa 240

cgggggaccg agtggaccgg acgaggatgt ggcctaggac gagtgcacaa ggctagtgga 300

ctcgggtcccc gcgcggtatc ccgagtggtc cactgtctgc aaacacgatt cacatagagc 360  
gggcagacgc gggagccgtc ctaggtgcac cggaagcaaa tccgtcgcct ggggtggattt 420  
gagtgcacgc gccacgtgt agcctcacag ctctccgtgg tcagatgtgt aaaattatca 480  
taatagtgt tttcaaata gttaaataat atatataggc aagttatatg ggtcaataag 540  
cagtaaaaag gcttatgaca tggtaaaatt acttacacca atatgcctta ctgtctgata 600  
tattttacat gacaacaaag ttacaagtac gtcattttaa aatacaagtt acttatcaat 660  
tgtagtgtat caagtaaag acaacaacc tacaaatttg ctattttgaa ggaacactta 720  
aaaaaatcaa taggcaagtt atatagtcaa taaactgcaa gaaggcttat gacatggaaa 780  
aattacatac accaatatgc tttattgtcc ggtatatattt acaagacaac aaagttataa 840  
gtatgtcatt taaaaataca agttacttat caattgtcaa gtaaatgaaa acaaacctac 900  
aaatttgta ttttgaagga acacctaaat tatcaaata agcttgctac gcaaaatgac 960  
aacatgctta caagttatta tcatcttaa gttagactca tcttctcaag cataagagct 1020  
ttatgggtgca aaaacaaata taatgacaag gcaaagatac atacatatta agagtatgga 1080  
cagacatttc tttacaaac tccatttgta ttactccaaa agcaccagaa gtttgtcatg 1140  
gctgagtcac gaaatgtata gttcaatctt gcaaagttgc ctttcctttt gtactgtgtt 1200

ttaacactac aagccatata ttgtctgtac gtgcaacaaa ctatcacc atgtatccca 1260

agatgctttt ttattgctat ataaactagc ttggctgtgc ttggaactca catcaattag 1320

cttaagtttc cataagcaag tacaatagc t 1351

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism:CaMV 35S gene

promoter

&lt;400&gt; 49

ccccagatta gccttttcaa tttcagaaag aatgctaacc cacagatggt tagagaggct 6  
0

tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagcaata atctccagga aatcaaatac 12  
0

cttcccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaactgcat caagaacaca 18  
0

gagaaagata tattttctcaa gatcagaagt actattccag tatggacgat tcaaggcttg 24  
0

cttcacaaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta aaaaggtagt tcccactgaa 30  
0

tcaaaggcca tggagtcaaa gattcaaata gaggacctaa cagaactcgc cgtaaagact 36  
0

ggcgaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca agaagaaaat cttcgtcaac 42  
0

atggtggagc acgacacact tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt ctcagaagac 48  
0

caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat 54  
0

tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtgg ctctacaaa 60

0

tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc 66

0

aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 72

0

tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac 78

0

tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga gagaacacgg 84

0

gggactgtcg ag 85

2

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:antisense

&lt;400&gt; 50

actagacggt cggcatctac tctattcctt tgccctcgga cgagtgctgg ggcgtcggtt 6  
0

tccactatcg gcgagtactt ctacacagcc atcgggtccag acggccgcgc ttctgcgggc 12  
0

gatttgtgta cgcccgacag tcccggctcc ggatcggacg attgcgtcgc atcgaccctg 18  
0

cgcccaagct gcatcatcga aattgccgtc aaccaagctc tgatagagtt ggtcaagacc 24  
0

aatgcggagc atatacgccc ggagccgcgg cgatcctgca agctccggat gcctccgctc 30  
0

gaagtagcgc gtctgtgtgt ccatacaagc caaccacggc ctccagaaga agatgttggc 36  
0



gacctcgtat tgggaatccc cgaacatcgc ctcgctccag tcaatgaccg ctgttatgcg 42  
0

gccattgtcc gtcaggacat tgttggagcc gaaatccgcg tgcacgaggt gccggacttc 48  
0

ggggcagtcc tcggcccaaa gcatcagctc atcgagagcc tgcgcgacgg acgcactgac 54  
0

ggtgtcgtcc atcacagttt gccagtata cacatgggga tcagcaatcg cgcataatgaa 60  
0

atcacgccat gtagtgtatt gaccgattcc ttgcggtccg aatgggccga acccgctcgt 66  
0

ctggctaaga tcggccgcag cgatcgcac catgacctcc gcgaccggct gaagaacagc 72  
0

gggcagttcg gtttcaggca ggtcttgcaa cgtgacaccc tgtgcacggc gggagatgca 78  
0

ataggtcagg ctctcgctga actccccaat gtcaagcact tccggaatcg ggagcgcggc 84  
0

cgatgcaaag tgccgataaa cataacgac tttgtagaaa ccatcggcgc agctatattac 90  
0

ccgcaggaca tatccagcc ctctacac gaagctgaaa gcacgagatt cttcgccctc 96  
0

cgagagctgc atcaggctcgg agacgctgtc gaacttttcg atcagaaact tctcgacaga 102  
0

cgtcgcggtg agttcaggct ttttcat 1047

<210> 51

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 51

aatgaagatc attttcgtat ttgctctcct tgctattggtt gcatgcaacg cttctgcacg 60

gtttgat

67

<210> 52

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 52

atgaagatca ttttc

15

<210> 53

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:control

sequence

<400> 53

ggatcccggg gtacc

15

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism:hygromycin

phosphotransferase gene

<400> 54

atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt ttctgatcga aaagttcgac 6  
0

agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcgaagaat ctcgtgcttt cagcttcgat 12  
0

gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg ccgatggttt ctacaaagat 18  
0

cgttatgttt atcggcactt tgcacgcggc gcgctcccga ttccggaagt gcttgacatt 24

0

ggggagttca gcgagagcct gacctattgc atctcccgcc gtgcacaggg tgtcacgttg 30

0

caagacctgc ctgaaaccga actgcccgtt gttcttcagc cggtcgcgga ggtcatggat 36

0

gcgatcgctg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccattcgg accgcaagga 42

0

atcgggtcaat acactacatg gcgtgatttc atatgcgcga ttgctgatcc ccatgtgtat 48

0

cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tcgcgcaggc tctcgatgag 54

0

ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc 60

0

tccaacaatg tcctgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagcgaggcg 66

0

atgttcgggg attccaata cgaggtcgcc aacatcttct tctggaggcc gtggttggct 72

0

tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcatc cggagcttgc aggatcgccg 78

0

cggctccggg cgtatatgct ccgcattggt cttgaccaac tctatcagag cttggttgac 84

0

ggcaatttcg atgatgcagc ttgggcgcag ggtcgatgcg acgcaatcgt ccgatccgga 90

0

gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc 96

0

tgtgtagaag tactcgccga tagtggaac cgacgcccc gactcgtcc gagggcaaag 102

0

gaatagagta gatgccgacc gtctagt 1047

<210> 55

<211> 265

<212> DNA

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism:Nos terminator

<400> 55

gaatttcccc gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc 60

cggctcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa 120

catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata 180

catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg 240

ggtgtcatct atgttactag atcgg

265

<210> 56

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial Sequence



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Modified HPT

&lt;400&gt; 56

Met Lys Lys Pro Glu Leu Thr Ala Thr Ser Val Glu Lys Phe Leu Ile

1

5

10

15

Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Asp Leu Met Gln Leu Ser Glu Gly Glu

20

25

30

Glu Ser Arg Ala Phe Ser Phe Asp Val Gly Gly Arg Gly Tyr Val Leu

35

40

45

Arg Val Asn Ser Cys Ala Asp Gly Phe Tyr Lys Asp Arg Tyr Val Tyr

50

55

60

Arg His Phe Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ile Pro Glu Val Leu Asp Ile

65

70

75

80

Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr Cys Ile Ser Arg Arg Ala Gln

85

90

95

Gly Val Thr Leu Gln Asp Leu Pro Glu Thr Glu Leu Pro Ala Val Leu

100

105

110

Gln Pro Val Ala Glu Val Met Asp Ala Ile Ala Ala Ala Asp Leu Ser

115

120

125

Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly Pro Gln Gly Ile Gly Gln Tyr

130

135

140

Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala Ile Ala Asp Pro His Val Tyr

145

150

155

160

His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr Val Ser Ala Ser Val Ala Gln

165

170

175

Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala Glu Asp Cys Pro Glu Val Arg

180

185

190

His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser Asn Asn Val Leu Thr Asp Asn

195

200

205

Gly Arg Ile Thr Ala Val Ile Asp Trp Ser Glu Ala Met Phe Gly Asp

210

215

220

Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe Phe Trp Arg Pro Trp Leu Ala

225

230

235

240

Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe Glu Arg Arg His Pro Glu Leu

245

250

255

Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr Met Leu Arg Ile Gly Leu Asp

260

265

270

Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly Asn Phe Asp Asp Ala Ala Trp

275

280

285

Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val Arg Ser Gly Ala Gly Thr Val

290

295

300

Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Trp Thr Asp Gly

305

310

315

320

Cys Val Glu Val Leu Ala Asp Ser Gly Asn Arg Arg Pro Ser Thr Arg

325

330

335

Pro Arg Ala Lys Glu

340

&lt;210&gt; 57

<211> 2158

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:CAMV35S-Modified HPT-NOS

<400> 57

ccccagatta gccttttcaa tttcagaaag aatgctaacc cacagatggt tagagaggct 60

tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagcaata atctccagga aatcaaatac 120

cttcccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaactgcat caagaacaca 180

gagaaagata tattttctcaa gatcagaagt actattccag tatggacgat tcaaggcttg 240

cttcacaaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta aaaaggtagt tcccactgaa 300

tcaaaggcca tggagtcaaa gattcaaata gaggacctaa cagaactcgc cgtaaagact 360  
ggcgaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca agaagaaaat cttcgtcaac 420  
atggtggagc acgacacact tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt ctcaagaagac 480  
caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat 540  
tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa 600  
tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc 660  
aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 720  
tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatccac 780  
tatecttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga gagaacacgg 840  
gggactgtcg agatgaaaaa gcctgaactc accgcgacgt ctgtcgagaa gtttctgac 900  
gaaaagtgcg acagcgtctc cgacctgatg cagctctcgg agggcgaaga atctcgtgct 960  
ttcagcttcg atgtaggagg gcgtggatat gtcctgcggg taaatagctg cgccgatgg 1020  
ttctacaaag atcgttatgt ttatcggcac tttgcatcgg ccgcgctccc gattccggaa 1080  
gtgcttgaca ttggggagtt cagcgagagc ctgacctatt gcctctcccg ccgtgcacag 1140  
ggtgtcacgt tgcaagacct gcctgaaacc gaactgcccg ctgttcttca gccggtcgcg 1200

gaggatcatgg atgcgatcgc tgcggccgat cttagccaga cgagcgggtt cggcccattc 1260  
ggaccgcaag gaatcgggtca atacactaca tggcgtgatt tcatatgcgc gattgctgat 1320  
cccatgtgt atcactggca aactgtgatg gacgacaccg tcagtgcgtc cgtcgcgcag 1380  
gctctcgatg agctgatgct ttgggccgag gactgccccg aagtccggca cctcgtgcac 1440  
gcggatttcg gctccaacaa tgcctgacg gacaatggcc gcataacagc ggtcattgac 1500  
tggagcgagg cgatgttcgg ggattcccaa tacgaggtcg ccaacatctt cttctggagg 1560  
ccgtggttgg cttgtatgga gcagcagacg cgctacttcg agcggaggca tccggagctt 1620  
gcaggatcgc cgcggctccg ggcgtatatg ctccgcattg gtcttgacca actctatcag 1680  
agcttggttg acggcaattt cgatgatgca gcttgggcgc agggtcgatg cgacgcaatc 1740  
gtccgatccg gagccgggac tgcggggcgt acacaaatcg cccgcagaag cgcggccgtc 1800  
tggaccgatg gctgtgtaga agtactcgcc gatagtggaa accgacgccc cagcactcgt 1860  
ccgagggcaa aggaatagag tagatgccga ccgtctagtg aatttccccg atcgttcaaa 1920  
catttgcaa taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat 1980  
ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt 2040



tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa 2100

caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttacta 2158

<210> 58

<211> 1757

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:promoter

<400> 58

ctgatgatta ttttgttgat catgattttc ttttggctat ttgatttttt gaaagatatt 60

ttttccctg ggaagacacc tatgggacga agatattatg tttcttatat agcaccaaac 120

aaatttaata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata 180  
tatatatata tatatatata tatatatata tatcacatca gtctctgcac aaagtgcac 240  
ctgggctgct tcaattataa agccccattc accacatttg ctagatagtc gaaaagcacc 300  
atcaatattg agcttcaggt atttttgggt gtgttgtggt tggattgatt ctaatatata 360  
ccaaatcaat ataattcact accaaaatat accatagcca tcacaacttt attaattttg 420  
gtagcttaag atggtatata taataaccaa ttaacaactg attctaattt tactacggcc 480  
cagtatgtac caatacaaaa caacgagtat gttttcttcc atcgtaatcg tacacagtac 540  
aaaaaaacct ggccagcctt tcttgggctg gggctctctt tcgaaaggtc acaaaacgta 600  
cacggcagta acgccgcttc gctgcgtgtt aacggccacc aaccccgccg tgagcaaacg 660  
gcatcagctt tccacctcct cgatatctcc gcggcgccgt ctggaccgcg cccctttccg 720  
ttcctttctt tccttctcgc gtttgcgtgg tggggacgga ctcccaaac cgcctctccc 780  
tctctccttt ctttatttgt ctatattctc actgggcccc acccaccgca cccctgggccc 840  
cactcacgag tccccccctc cccacctata aataccccac cccctcctcg cctcttctc 900  
cgtcaatcga accccaaaat cgcagagaaa aaaaaatctc ccctcgaagc gaagcgtcga 960

atcgcccttct caaggtatgc gattttctga tcctctccgt tcctcgcgtt tgatttgatt 1020  
tcccggcctg ttcgtgattg tgagatgttg tggtagtct ccgttttgcg atctgtggta 1080  
gatttgaaca ggtttagatg gggttcgcgt ggtatgctgg atctgtgatt atgagcgatg 1140  
ctgttcgtgg tccaagtatt gattggttcg gatctagtag tagaactgtg ctagggttgt 1200  
gattcgttcc gatctgttca attagtagga ttagtctct gtttttctcg ttgatccaag 1260  
tagcagcttc aggtatattt tgcttaggtt gtttttgatt cagtcctct agttgcatag 1320  
attctactct gttcatgttt aatctaaggg ctgcgtcttg ttgattagt attacatagc 1380  
atagctttca ggatatttta ctgcttatg cctatcttat caactgttgc acctgtaaat 1440  
tctagcctat gttataacct gccttatgtg ctctcgggat agtgctagta gttattgaat 1500  
cagtttgccg atggatttct agtagttcat agacctgcat attatttttg tgaacacgag 1560  
cacggtgcgt ctctctattt tgtaggtca ctgttggtgt tgataggtag actgatgtta 1620  
ttgtggttta ggtcgtgtat ctaacatatt ggaataattt gattgactga tttctgctgt 1680  
acttgcttgg tattgttata atttcatgtt catagttgct gaccatgctt cggttaattgt 1740  
gtgtgcagat ctctaga

1757

<210> 59

<211> 926

<212> DNA

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism:GUS gene partial

fragment

<400> 59

gatatctacc cgcttcgcgt cggcatccgg tcagtggcag tgaagggcga acagttcctg 60

attaaccaca aaccgttcta ctttactggc tttggtcgtc atgaagatgc ggacttacgt 120

ggcaaaggat tcgataacgt gctgatgggtg cacgaccacg cattaatgga ctggattggg 180

gccaactcct accgtacctc gcattaccct tacgctgaag agatgctcga ctgggcagat 240  
gaacatggca tcgtggtgat tgatgaaact gctgctgtcg gctttaacct ctctttaggc 300  
attggtttcg aagcgggcaa caagccgaaa gaactgtaca gcgaagaggc agtcaacggg 360  
gaaactcagc aagcgcactt acaggcgatt aaagagctga tagcgctga caaaaaccac 420  
ccaagcgtgg tgatgtggag tattgccaac gaaccggata cccgtccgca agtgcacggg 480  
aatatttcgc cactggcgga agcaacgcgt aaactcgacc cgacgcgtcc gatcacctgc 540  
gtcaatgtaa tgttctgcga cgctcacacc gataccatca gcgatctctt tgatgtgctg 600  
tgcctgaacc gttattacgg atggtatgtc caaagcggcg atttggaac ggcagagaag 660  
gtactggaaa aagaacttct ggctggcag gagaaactgc atcagccgat tatcatcacc 720  
gaatacggcg tggatacggt agccgggctg cactcaatgt acaccgacat gtggagtga 780  
gagtatcagt gtgcatggct ggatatgtat caccgcgtct ttgatcgctg cagcgccgtc 840  
gtcggatgaac aggtatggaa tttcgccgat tttgcgacct cgcaaggcat attgcgcgtt 900  
ggcggtaaca agaaaggat cttcac 926

<210> 60

<211> 1002

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> 13 kDa prolamine promoter sequence

<400> 60

cttctacatc ggcttaggtg tagcaacacg actttattat tattattatt attattatta 6  
0

ttattttaca aaaatataaa atagatcagt ccctcaccac aagtagagca agttggtgag 12  
0

ttattgtaaa gttctacaaa gctaatttaa aagttattgc attaacttat ttcattattac 18  
0

aaacaagagt gtcaatggaa caatgaaaac catatgacat actataattt tgttttttatt 24

0

attgaaatta tataattcaa agagaataaa tccacatagc cgtaaagttc tacatgtggt 30

0

gcattaccaa aatatatata gcttacaaaa catgacaagc ttagtttgaa aaattgcaat 36

0

ccttatcaca ttgacacata aagtgagtga tgagtcataa tattattttc ttgctaccc 42

0

atcatgtata tatgatagcc acaaagttac ttgatgatg atatcaaaga acatttttag 48

0

gtgcacctaa cagaatatcc aaataatatg actcacttag atcataatag agcatcaagt 54

0

aaaactaaca ctctaaagca accgatggga aagcatctat aaatagacaa gcacaatgaa 60

0

aatcctcatc atccttcacc acaattcaaa tattatagtt gaagcatagt agtagaatcc 66

0

aacaaca 66

7

<210> 61

<211> 163

<212> DNA

<213> rice

<220>

<223> 10kDa prolamine terminator

<400> 61

tcaaacgttg gttacatgta ctctagtaat aagggtgtgc atactatcgt gtgcaaacac 60

tagaaataag aaccattgaa taaaatatca atcattttca gacttgcaaa tattgggtat 120

ttggattttct gtcccatgtc cctcttgaaa gccatgctgt aca 163



<210> 62

<211> 984

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> GLUTELIN-A3 promoter

<400> 62

agaagaaaga taaataaccg aaactatttg gagagcattc aggttacatg gttagtccat 60

ggtgctagat attgctatat aatactcaat gcaatgctca atagatataa gtttcaaagc 120

tgtataagaa ttttaggtta gtgtgcaatg taagtgtagc ttcttatagc ttagtgcttt 180

actatcttca caagcacatg ctatagtatt gttccaagat gaaagaataa ttcaccccttg 240

ctaccaactt gcatgatatt atatttgtga ataccctatc tcttggctta taatgaaatg 300

tgctgctggg ttatacctga ccatggtatt tgagagacct ttgtatagct gaaaccaacg 360  
tatatgcgag catggaacaa gagaacaaaa tgcaaggatt tttttatact ggttcatgcc 420  
cctggatggg ttaatatcgt gatcatcaaa aaagatatgc ataaaattaa agtaataaat 480  
ttgctcataa gaaacacaaa ccaaaagcac atatgtccta acaaaactgc attttgtttg 540  
tcatgtagca atacaagaga taatatatga cgtgggttatg acttattcac tttttgtgac 600  
tccaaaatgt agtaggtcta actgattgtt taaagtgatg tgcttactgt agaagtttca 660  
tccaaaagc aatcactaaa gcaacacaca acgtatagtc caccttgac gtaattcttt 720  
gtggaagata acaagaaggc tcactgaaaa ataaaagcaa agaaaaggat atcaaacaga 780  
ccattgtgta tccattgat acttgtatgt ctatttatct atccaccttt tgtgtacctt 840  
acttctatct agtgagtcac ttcatatgtg gacattaaca aactctatct taacatctag 900  
tcgatcacta ctttacttca ctataaaagg accaacatat atcaccattt ctacacaaaag 960  
cattgagttc agtcccacaa aaac 984

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 63

atgaagatca ttttcgtatt tgctctcctt

30

<210> 64

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 64

atgaagatca ttttcgtatt tgctctcctt gctattgttg catgc

45

<210> 65

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 65

caaagttata gacaatatca actacaatcg

30

<210> 66

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 66

gagttcgtaa ttcaa

15

<210> 67

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 67

gagttcgtaa ttcaacagca tagcatagtg gcaaccccct tctgg

45

<210> 68

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 68

caacaatctc actaccaggc cattagtagc gttcaggcga ttgtg

45

<210> 69

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 69

gctcaagctc aagct

15

<210> 70

<211> 30

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 70

tactttgatc agactcaagc tcaagctcaa

30

<210> 71

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 71

tgcagcagca gtgttg

16

<210> 72

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

&lt;400&gt; 72

tgcagcagca gtgttgccaa cag

23

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:antisense

&lt;400&gt; 73

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Cys Asn

1

5

10

15

Ala Ser Ala Arg Phe Asp

20

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 74

Met Lys Ile Ile Phe

1

5

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 75

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu

1

5

10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 76

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala

1

5

10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 77

Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln Leu Gln Ser

1

5

10

<210> 78

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 78

Glu Phe Val Arg Gln

1

5

<210> 79

<211> 15



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 79

Glu Phe Val Arg Gln Gln His Ser Ile Val Ala Thr Pro Phe Trp

1

5

10

15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 80

Gln Gln Ser His Tyr Gln Ala Ile Ser Ser Val Gln Ala Ile Val

1

5

10

15

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 81

Ala Gln Ala Gln Ala

1

5

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 82

Tyr Phe Asp Gln Thr Gln Ala Gln Ala Gln

1

5

10

<210> 83

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 83

Gln Gln Gln Cys Cys

1

5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

<400> 84

Gln Gln Gln Cys Cys Gln Gln

1

5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: motif

<400> 85

Glu Phe Val Arg Gln Gln Cys Ser Pro

1

5

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: motif

<400> 86

Cys Gln Val Met Gln Gln Gln Cys Cys Gln Gln

1

5

10

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: motif

<400> 87

Gln Gln Cys Cys Gln Gln

1

5

<210> 88



<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: motif

<400> 88

Glu Phe Val Arg Gln Gln

1

5

<210> 89

<211> 144

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> RM4

<400> 89

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ser

1

5

10

15

Ala Ser Ala Gln Phe Asp Val Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln

50

55

60

Ser Ala Ala Phe Gln Leu Gln Gln Leu Ala Leu Val Ala Gln Gln Ser

65

70

75

80

His Tyr Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala Ile Ala Gln Gln Leu Gln

85

90

95

Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Ala Gln Ala

100

105

110

Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Val Pro Ser Arg Tyr Gly Ile Tyr Pro

115

120

125

Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr Thr Leu Gly Gly Val Leu

130

135

140

<210> 90

<211> 156

<212> PRT

<213> Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; RM5

&lt;400&gt; 90

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Cys Asn

1

5

10

15

Ala Ser Ala Arg Phe Asp Ala Leu Ser Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser His Leu Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Cys Ser

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln His Ser Ile Val Ala Thr Pro Phe Trp Gln

50

55

60

Pro Ala Thr Phe Gln Leu Ile Asn Asn Gln Val Met Gln Gln Gln Cys

65

70

75

80

Cys Gln Gln Leu Arg Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln Ala Ile

85

90

95

Ser Ser Val Gln Ala Ile Val Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Val Gly

100

105

110

Val Val Tyr Phe Asp Gln Thr Gln Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala

115

120

125

Leu Asn Leu Pro Ser Ile Cys Gly Ile Tyr Pro Asn Tyr Tyr Ile Ala

130

135

140

Pro Arg Ser Ile Pro Thr Val Gly Gly Val Trp Tyr

145

150

155

<210> 91

<211> 158

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> RM7

<400> 91

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Cys Asn

1

5

10

15

Arg Ser Ala Arg Phe Asp Pro Leu Ser Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln

20

25

30

Leu Gln Ser His Leu Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Cys Ser

35

40

45

Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Ser Ile Val Ala Thr Pro Phe Trp Gln

50

55

60

Pro Ala Thr Phe Gln Leu Ile Asn Asn Gln Val Met Gln Gln Gln Arg

65

70

75

80



Met Cys Cys Gln Gln Leu Arg Leu Val Ala Gln Gln Ser His Tyr Gln

85

90

95

Ala Ile Ser Ile Val Gln Ala Ile Val Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln

100

105

110

Phe Ser Gly Val Tyr Phe Asp Gln Thr Gln Ala Gln Ala Gln Thr Leu

115

120

125

Leu Thr Phe Asn Leu Pro Ser Ile Cys Gly Ile Tyr Pro Asn Tyr Tyr

130

135

140

Ser Ala Pro Arg Ser Ile Ala Thr Val Gly Gly Val Trp Tyr

145

150

155

<210> 92

<211> 134

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> RM10

<400> 92

Met Ala Ala Tyr Thr Ser Lys Ile Phe Ala Leu Phe Ala Leu Ile Ala

1

5

10

15

Leu Ser Ala Ser Ala Thr Thr Ala Ile Thr Thr Met Gln Tyr Phe Pro

20

25

30

Pro Thr Leu Ala Met Gly Thr Met Asp Pro Cys Arg Gln Tyr Met Met

35

40

45

Gln Thr Leu Gly Met Gly Ser Ser Thr Ala Met Phe Met Ser Gln Pro

50

55

60

Met Ala Leu Leu Gln Gln Gln Cys Cys Met Gln Leu Gln Gly Met Met

65

70

75

80

Pro Gln Cys His Cys Gly Thr Ser Cys Gln Met Met Gln Ser Met Gln

85

90

95

Gln Val Ile Cys Ala Gly Leu Gly Gln Gln Gln Met Met Lys Met Ala

100

105

110

Met Gln Met Pro Tyr Met Cys Asn Met Ala Pro Val Asn Phe Gln Leu

115

120

125

Ser Ser Cys Gly Cys Cys

130

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 149

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; RM16

&lt;400&gt; 93

Met Lys Ile Phe Val Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser Ser

1

5

10

15

Ala Ser Ala Gln Phe Asp Ala Cys Thr Tyr Gly Gln Cys Gln Gln Gln

20

25

30

Pro Phe Met Gln Pro Ile Met Asn Pro Cys Asn Glu Phe Val Arg Gln

35

40

45

Gln Cys Ser Pro Met Ser Leu Pro Trp Lys Gln Ser Arg Arg Leu Gln

50

55

60

Leu Ser Ser Cys Gln Val Met Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Met Arg

65

70

75

80

Leu Met Ala Gln Gln Tyr His Cys Gln Ala Ile Cys Thr Met Val Gln

85

90

95

Ser Ile Met Gln Gln Val Gln Phe Asp Ala Gly Phe Val Gly Glu Pro

100

105

110

Gln Ala Gln Ala Gln Ala Gln Val Ala Leu Asn Leu Pro Ser Met Cys

115

120

125

Gly Val Tyr Pro Arg Tyr Cys Ser Thr Pro Cys Lys Val Ala Thr Gly

130

135

140

His Cys Gly Ser Trp

145

<210> 94

<211> 596

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> RM4

&lt;400&gt; 94

gcaaaataga aagatctagt gtcccgccgc aatgaagatc attttcgtct ttgctctcct 60  
tgctattgct gcatgcagcg cctctgcgca gtttgatggt ttaggtcaaa gttataggca 120  
atatcagctg cagtcgcctg tcctgctaca gcaacagggt cttagcccat ataatgagtt 180  
cgtaaggcag cagtatggca tagcggcaag ccccttcttg caatcagctg cgtttcaact 240  
gagaaacaac caagtctggc aacagctcgc gctggtggcg caacaatctc actatcagga 300  
cattaacatt gttcaggcca tagcgcagca gctacaactc cagcagtttg gtgatctcta 360  
ctttgatcgg aatctggctc aagctcaagc tctgttggct tttaacgtgc catctagata 420  
tggtatctac cctaggtact atggtgcacc cagtaccatt accacccttg gcggtgtctt 480  
gtaatgagtt ttaacagtat agtggttcgg aagttaaaaa taagctcaga tatcatatat 540  
gtgacatgtg aaactttggg tgatataaat agaaaaaag ttgtctttca tattta 596

&lt;210&gt; 95



<211> 597

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> RM5

<400> 95

caattcaaac attatagttg aagcatagta gtagaatcct acaaaaatga agatcatttt 60

cgtatttgct ctccttgcta ttgttgcatg caacgcttct gcacggtttg atgctcttag 120

tcaaagttat agacaatatt aactacaatc gcattctctg ctacagcaac aagtgtctag 180

cccatgcagt gatttcgtaa ggcaacagca tagcatagtg gcaaccccct tctggcaacc 240

agctacgttt caattgataa acaaccaagt catgcagcaa cagtgttgcc aacagctcag 300

gctggtagcg caacaatctc actaccaggc cattagtagc gttcaggcga ttgtgcagca 360

actacagctg cagcaggctg gtgttgctta ctttgatcag actcaagctc aagctcaagc 420

tttgctggcc ttaaacttgc catccatatg tggatctat cctaactact acattgctcc 480

gaggagcatt cccaccgttg gtggtgtctg gtactgaatt gtaatagtat aatggttcaa 540

atgttaaaaa taaagtcag catcatcatg cgtgacagtt gaaaaaaaaa aaaaaaa 597

<210> 96

<211> 609

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> RM7

<400> 96

gaagcatagt agtagaatcc aacaacaatg aagatcattt tcgtatttgc tctccttgct 60  
attgttgcat gcaatcgctc tgcgcggttt gatcctctta gtcaaagta taggcaatat 120  
caactacagt cgcattctct actacagcaa caagtgtcga gcccatgcag tgagttcgta 180  
aggcaacagt atagcatagt ggcaaccccc ttctggcaac cagctacgtt tcaattgata 240  
aacaaccaag tcatgcagca gcagtgttgc caacagctca ggctggtagc acaacaatct 300  
cactaccagg ccattagtat tgttcaagcg attgtgcaac agctacaact gcagcaattt 360  
agtgggtgtct actttgatca gactcaagct caagcccaaa ctctgttgac cttcaacttg 420  
ccatccatat gtggtatcta ccctaactac tatagtgtc ccaggagcat tgccactgtt 480  
gggtgggtgtct ggtactgaat tgtaacaata taatagttcg tatgttaaaa ataaagtcac 540  
acatcatcat gtgtgactgt tgaaacttag ggtcatataa atctaaataa aatcatctta 600  
cctaaaaaa 609

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 1002

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> intron sequence

<400> 97

tctagatcta agaatggtcc gtgccttaaa actttcccca accgtgctag tttatgttgt 60

gactgtctgc ctctctcagt ttacttggat gcattgacaa catccttttt tgctattact 120

cgtatttgct ctatagctgg tggcatatct catgttgaaa ttgccccttt taatccaaaa 180

ttggatgtaa ttgaaagaat cctacgtggt agttatttgg attttggtgt gaaaaaaaaat 240

agccttggtta gaagaagcaa aattggattt agttaaaagg atactagatg gtgttatttg 300

gattttggtg caaatcaaat taggagggtg gttttattca agttaagtt tgttttaaaa 360

aaattctcct aaaaagatag atactagatt tgcatatatg cattgaaaat tacatcttcg 420

cttggcgggtt atacttttag tccctctaaa ttgttcaatc atttatgatg aaaaggaaaa 480

tcattttata tcacaaagta tttatgatga aaggggaaaa atattctgca tgggtttgaa 540  
caaaatacgt ggattggtgt agccttaaca tacttgaaaa gggtatgatg ttgatgtagt 600  
gcccatggtg tgtcgcttga cattaaaacg atatgcagtc aggattgagg aacattgctg 660  
acaatttact atcgctgtct gtgttgacca caataattca gatgtacat cctatcttct 720  
aactagaaag atgcatggaa gtttcttaca ttatttccag cacttgaaat tttagtgaat 780  
tatcattaaa acataaccac ttactttgct gtgatatgaa ataatgttt tatttcttgg 840  
aaagtggat attcatatat tcttacagta aatttattga ttttcttttc atttatttct 900  
aaattttaac cacccttttg gtagcttaag gaaaattgta tgtttgacag tcctgttttc 960  
tgttgtttca tccctccagg aaaaccagct actagtggat cc 1002

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

図 1 は本発明のプロラミンアンチセンス遺伝子およびそれを用いた発現ベクターの構築を容易ならしめるための、既存のベクターおよびプロモーターの改変バージョンを示した図である。これらを利用することにより、迅速な発現ベクターの構築が可能となる。

##### 【図 2】

図 2 は、実際に構築して導入したプロラミンアンチセンス遺伝子発現ベクターの構造の概略を示した図である。

##### 【図 3】

図 3 は、本発明の種子である LP 1 3 K (1 3 K D a プロラミンアンチセンス

系統)におけるタンパク質をSDS-PAGEによる電気泳動法により分析した結果である。写真右側には、主要な貯蔵タンパク質に相当するバンドを表示しており、それぞれA:10kDaプロラミンB:13kDaプロラミンC:16kDaプロラミンD:グルテリン塩基性サブユニットE:26kDaグロブリンF:グルテリン酸性サブユニットである。縦に示した数字は分子量の目安である。通常品種(レーン1、2、7)と比較して、LP13K(レーン4、5)ではプロラミン、特にBに相当するバンドが薄くなり、タンパク質が減少している様子がうかがえる。また、低グルテリン品種であるLGC-1においてはプロラミン、特にBに相当する13kDaプロラミンの著しい増大が認められるが(図3および8)、13kDaプロラミンアンチセンス遺伝子を導入したLG-LP13K系統(レーン6)においては、低グルテリンである形質が維持されたまま、プロラミンの低下が認められ、貯蔵タンパク質量は大きく低下している。図中(およびこれ以降の図)の記号は以下のものを表す:LP13K:13kDaプロラミンアンチセンス遺伝子を導入した結果、13kDaプロラミンが顕著に減少した系統の総称;P:10kDaプロラミンプロモーターをアンチセンス遺伝子発現に利用;G:グルテリンGlub1プロモーターをアンチセンス遺伝子発現に利用;9-ORFAS:13kDaプロラミンのうち、クローンRM9のコード領域全体をアンチセンス遺伝子として利用;1-67bAS:13kDaプロラミンのうち、コード領域のうち67bpをアンチセンス遺伝子として利用;N:通常品種(おもに日本晴)を遺伝子導入宿主に利用;LG:低グルテリン品種(LGC-1)を遺伝子導入に利用。

#### 【図4A】

図4(AおよびB)は、様々な構造の13kDaプロラミンアンチセンス構築物を導入した種子のタンパク質をSDS-PAGEにより分析した結果である。a)は、プロラミンプロモーターおよび13kDaプロラミンクローンRM9のコード領域のアンチセンスを表し、b)は、プロラミンプロモーターおよび13kDaプロラミンクローンRM9のコード領域のアンチセンスを表し、c)は、プロラミンプロモーターおよび13kDaプロラミンクローンRM1のコード領域のアンチセンス(67bpのみ)を表し、d)は、プロラミンプロモーターお

よび 13 kDa プロラミンクロン RM9 のコード領域のアンチセンス (67 bp のみ) を表し、e) は、a) の系統を 3 世代進めた後を表し、f) は、a) と同じ構築遺伝子を LGC-1 に導入した例を表し、g) は、d) と同じ構築遺伝子を LGC-1 に導入した例を表す。レーン上の記号は以下のとおりである。R はハイグロマイシン培地でも生育した個体、S は、枯死した個体である。レーン横の記号については、F は、グルテリン酸性サブユニットであり、E は 26 kDa グロブリンであり、D はグルテリン塩基性サブユニットであり (これら 3 つは、プロテインボディ Type 2 に蓄積した)、C は 16 kDa プロラミンであり、B は 13 kDa プロラミンであり、A は 10 kDa プロラミンである (これら 3 つは、プロテインボディ Type I に蓄積した)。

#### 【図 4 B】

図 4 (A および B) は、様々な構造の 13 kDa プロラミンアンチセンス構築物を導入した種子のタンパク質を SDS-PAGE により分析した結果である。a) は、プロラミンプロモーターおよび 13 kDa プロラミンクロン RM9 のコード領域のアンチセンスを表し、b) は、プロラミンプロモーターおよび 13 kDa プロラミンクロン RM9 のコード領域のアンチセンスを表し、c) は、プロラミンプロモーターおよび 13 kDa プロラミンクロン RM1 のコード領域のアンチセンス (67 bp のみ) を表し、d) は、プロラミンプロモーターおよび 13 kDa プロラミンクロン RM9 のコード領域のアンチセンス (67 bp のみ) を表し、e) は、a) の系統を 3 世代進めた後を表し、f) は、a) と同じ構築遺伝子を LGC-1 に導入した例を表し、g) は、d) と同じ構築遺伝子を LGC-1 に導入した例を表す。レーン上の記号は以下のとおりである。R はハイグロマイシン培地でも生育した個体、S は、枯死した個体である。F は、グルテリン酸性サブユニットであり、E は 26 kDa グロブリンであり、D はグルテリン塩基性サブユニットであり (これら 3 つは、プロテインボディ Type 2 に蓄積した)、C は 16 kDa プロラミンであり、B は 13 kDa プロラミンであり、A は 10 kDa プロラミンである (これら 3 つは、プロテインボディ Type I に蓄積した)。

#### 【図 5】

図5は、様々な構造のプロラミンアンチセンス遺伝子発現カセットを導入したイネのうち、抑制効果が顕著である系統について、種子をランダムに選び、プロラミン低減形質を抗13kDaプロラミン（日本晴）抗体を用いたウェスタンブロット解析により調査したものである。図中a）では、SDS-PAGE後にクマシーブリリアントブルー染色を行った（種子抽出タンパク質15 $\mu$ lを使用した）。b）では、SDS-PAGE後にPVDF膜に転写し、抗13kDaプロラミン（日本晴）ポリクローナル抗体でウェスタン解析を行った（種子抽出タンパク質0.5 $\mu$ lを使用した）。レーン下にバンドの吸光度の相対比率を示した。

#### 【図6a】

図6（aおよびb）はLP13Kの胚乳表層細胞を透過電顕で観察した映像を示す。aでは観察像そのままを提示しており、bではそれにプロテインボディアのタイプを重ねて表示している。プロテインボディ1は、グレーの球形をした顆粒である（プロラミンが蓄積する）。b）では、黒三角で示す。プロテインボディ2は、色が黒く（濃く）見えるやや大きめの顆粒である（グルテリンおよびグロブリンが蓄積する）。b）では、白三角で示す。

通常品種における観察像（b2）と比較して、LP13K（b1）ではプロラミンが蓄積するはずのプロテインボディ1の数が大きく減少している。LGC-1（b3）においては逆にプロテインボディ2の数が大きく減少する一方でプロテインボディ1の数は大きく増加している。このように、プロラミンを制御することでプロテインボディ形成を制御し得ること、かつ表層細胞の内部の状態を大きく変えることができることが示された。

#### 【図6b】

図6（aおよびb）はLP13Kの胚乳表層細胞を透過電顕で観察した映像を示す。aでは観察像そのままを提示しており、bではそれにプロテインボディアのタイプを重ねて表示している。プロテインボディ1は、グレーの球形をした顆粒である（プロラミンが蓄積する）。b）では、黒三角で示す。プロテインボディ2は、色が黒く（濃く）見えるやや大きめの顆粒である（グルテリンおよびグロブリンが蓄積する）。b）では、白三角で示す。



通常品種における観察像 (b 2) と比較して、LP13K (b 1) ではプロラミンが蓄積するはずのプロテインボディ 1 の数が大きく減少している。LGC-1 (b 3) においては逆に往路手員ボディ 2 の数が大きく減少する一方でプロテインボディ 1 の数は大きく増加している。このように、プロラミンを制御することでプロテインボディ形成を制御し得ること、かつ表層細胞の内部の状態を大きく変えることができることが示された。

#### 【図 7】

図 7 は、いろいろなイネ品種の種子タンパク質 SDS-PAGE パターン (a) および抗 13 kDa プロラミン (日本晴) 抗体を用いたウェスタン解析 (b) を示す。図 7 は様々な品種の種子タンパク質の電気泳動パターンと、抗 13 kDa プロラミン抗体を用いたウェスタン解析の結果である。抗体作製に用いた日本晴プロラミンと極めて類似したプロラミンが、多様な品種においても共通してみられることを明示している。図中 a) では、SDS-PAGE 後にクマシーブリリアントブルー染色を行った (種子抽出タンパク質 10  $\mu$ l を使用した)。b) では、SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写し、抗 13 kDa プロラミン (日本晴) ポリクローナル抗体でウェスタン解析を行った (種子抽出タンパク質 0.5  $\mu$ l を使用した)。

#### 【図 8】

図 8 は、本発明を有用タンパク質発現システムとしての応用の可能性を検証するために用いた発現ベクター構造の例を示したものである。

#### 【図 9 A】

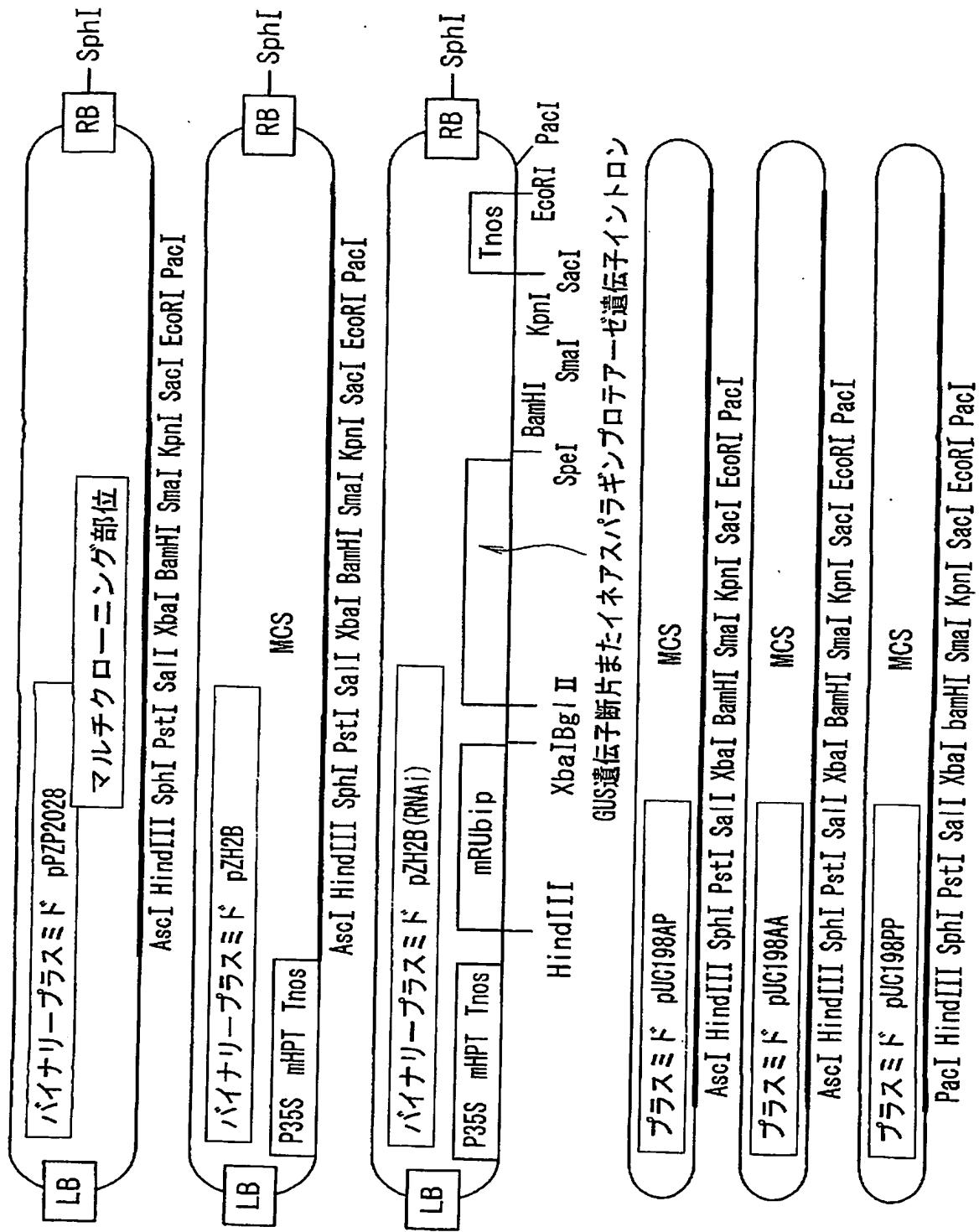
代表的なプロラミンの配列の比較図である。

#### 【図 9 B】

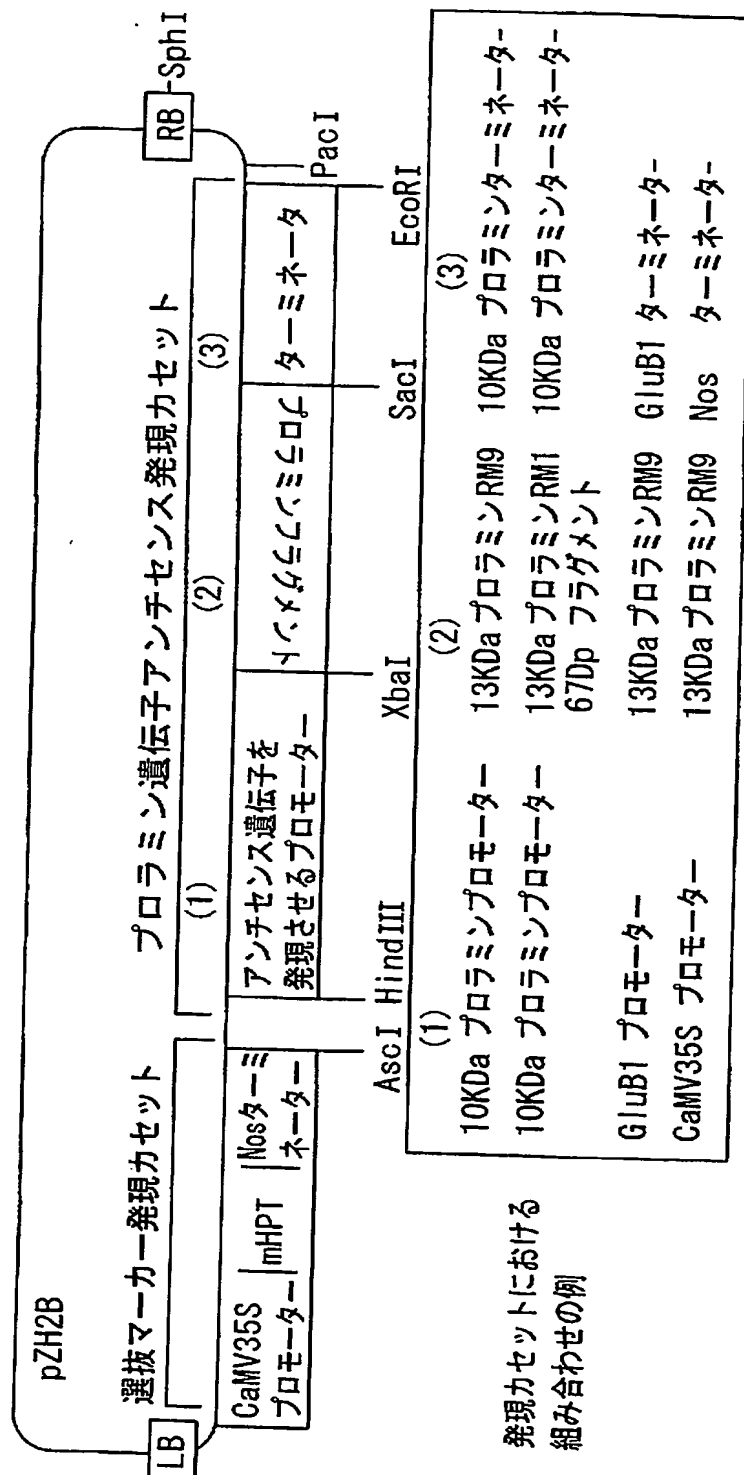
代表的なプロラミンの配列の比較図の続きである。

【書類名】 図面

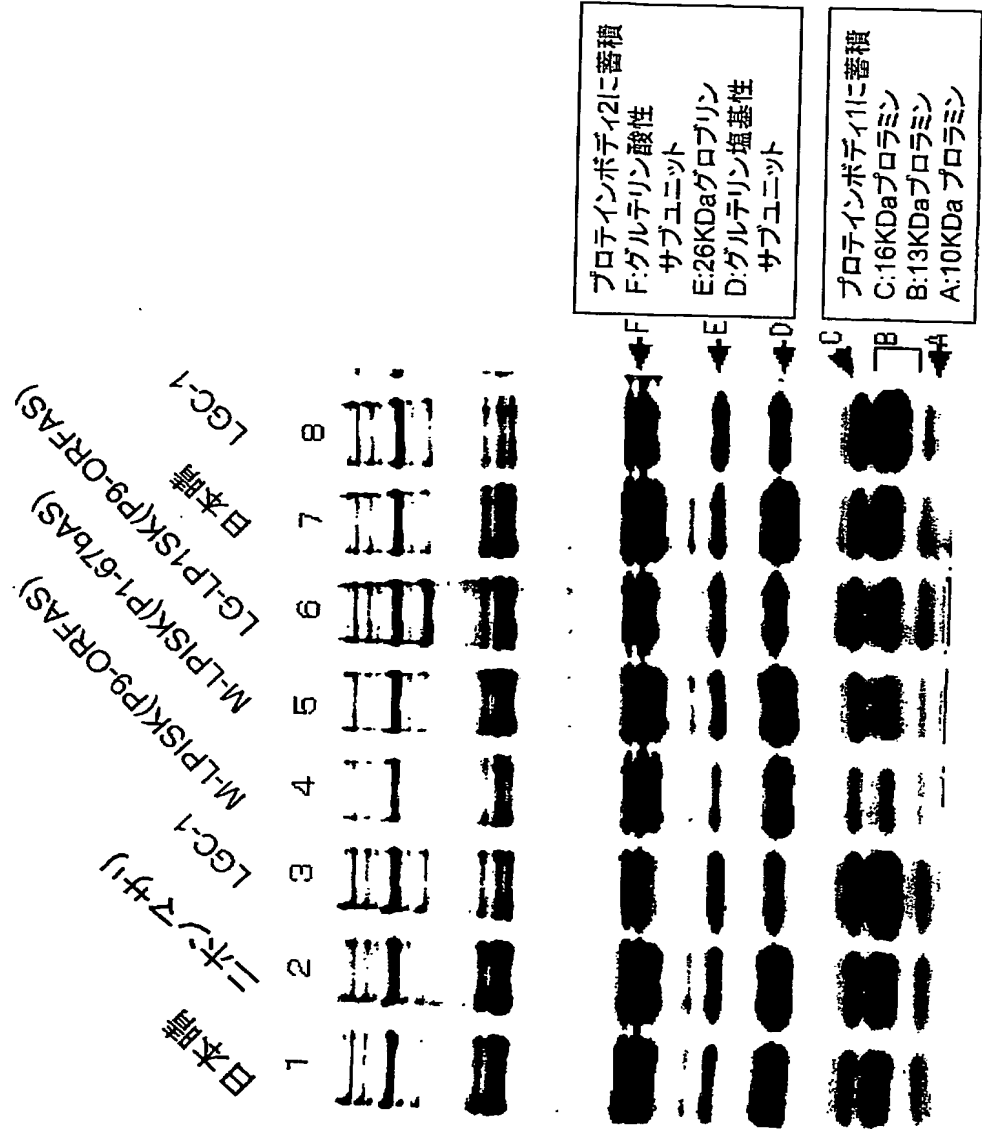
【図1】



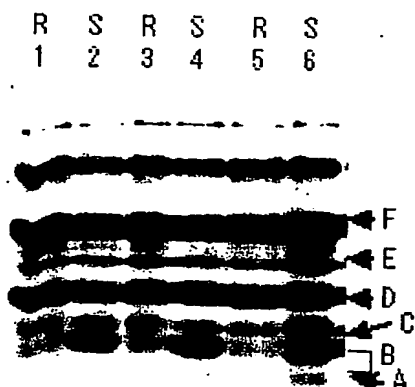
【図 2】



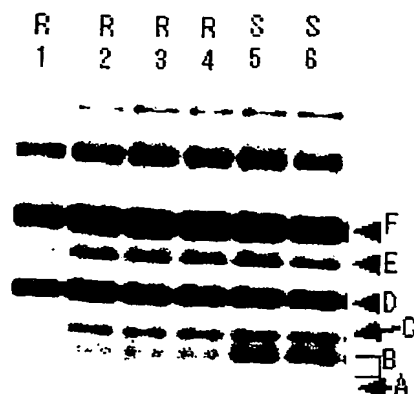
【図3】



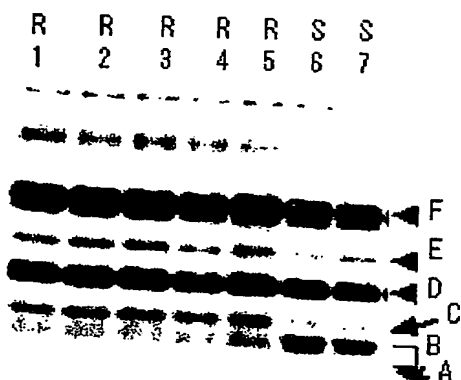
【図4A】



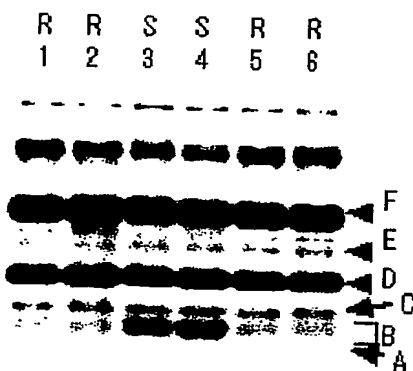
a)プロラミンプロモーターと13KDa  
プロラミンクローンRM9のコード  
領域のアンチセンス (P9-ORFAS)



b)プロラミンプロモーターと13KDa  
プロラミンクローンRM1のコード  
領域のアンチセンス (P1-ORFAS)



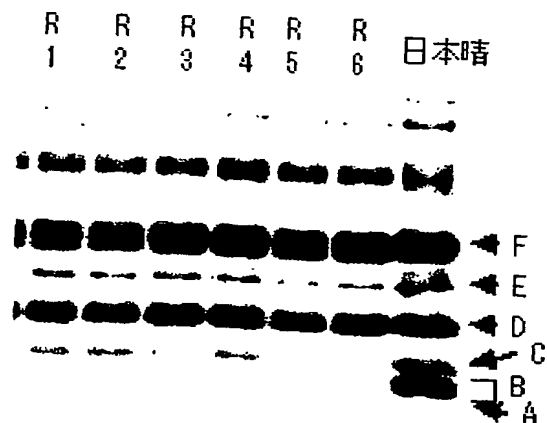
c)プロラミンプロモーターと13KDa  
プロラミンクローンRM1のコード  
領域(67dpのみ)のアンチセンス  
(P1-67bAS)



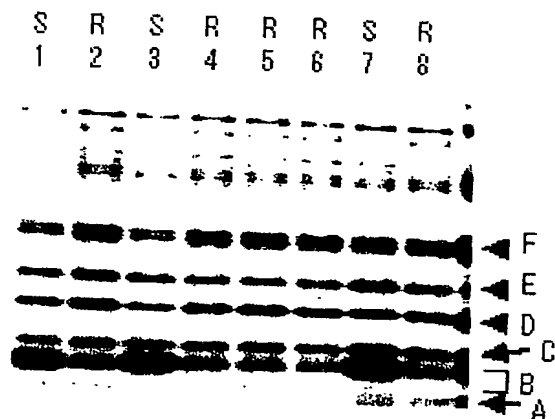
d)グルテリンプロモーターと13KDa  
プロラミンクローンRM9のコード  
領域のアンチセンス (G9-ORFAS)

RS

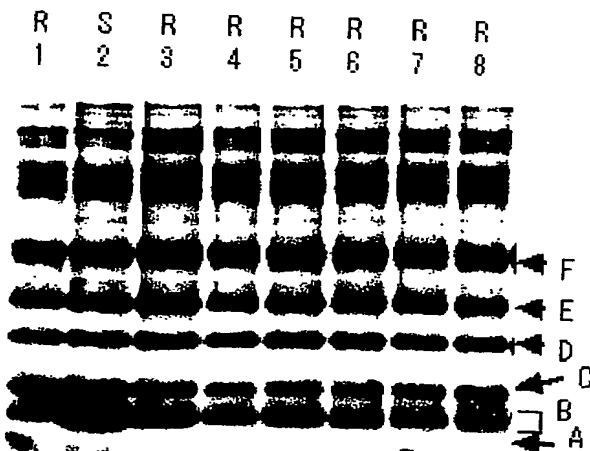
【図4B】



e) a) の系統を3世代進めた後

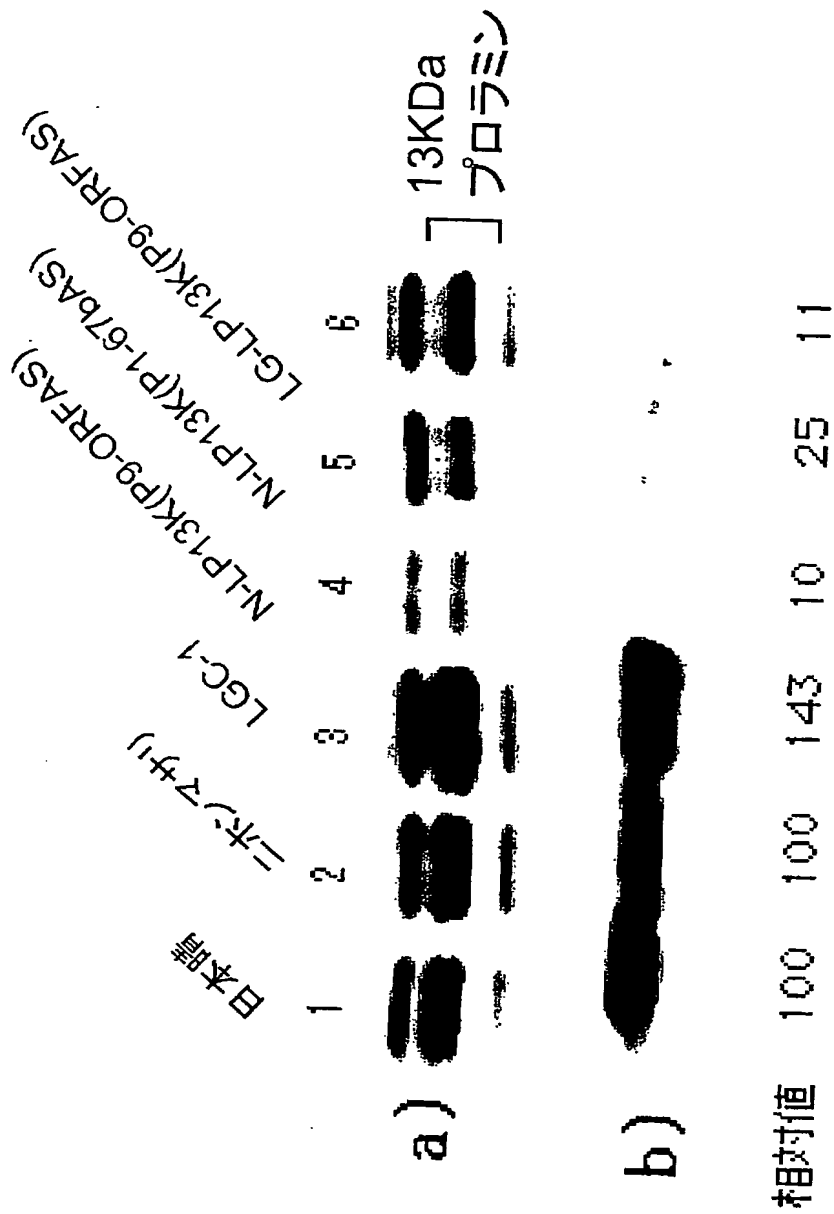


f) a)と同じ構築遺伝子をLGC-1に導入した例



g) d)と同じ構築遺伝子をLGC-1に導入した例

【図 5】

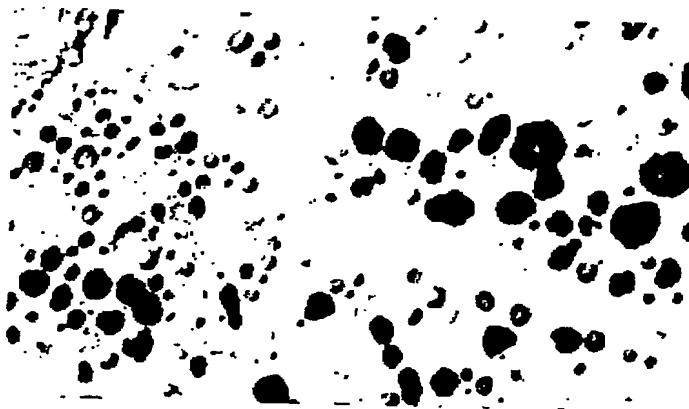


【図 6 a】

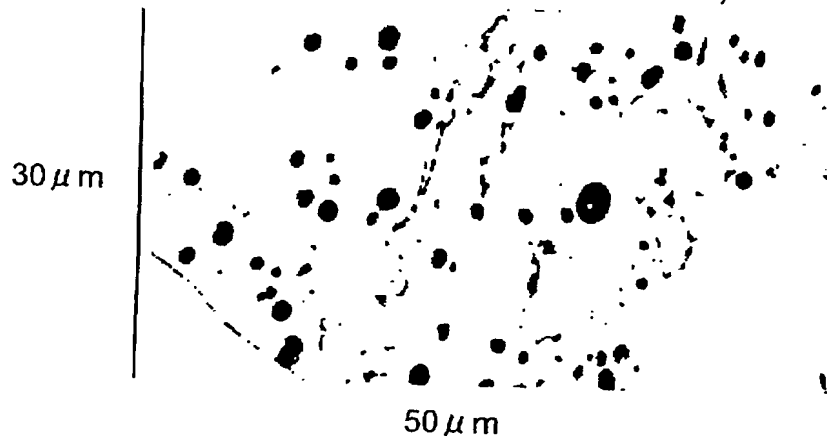
a-1) 13KDaプロラミンアンチセンス遺伝子導入品種  
(N-LP13K-P9-ORFAS)



a-2) 通常品種(日本晴)



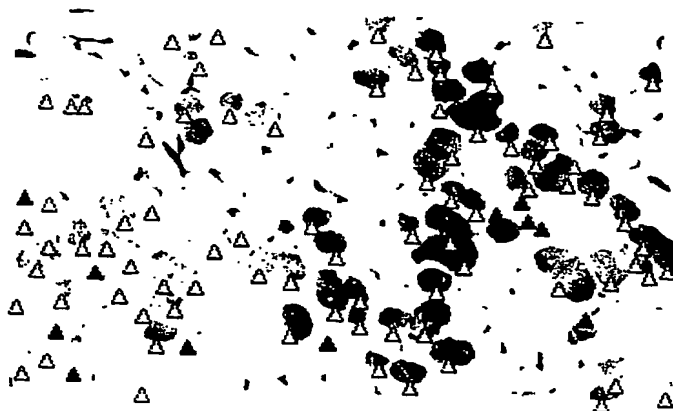
a-3) 低グルテリンかつ高プロラミン品種 (LGC-1)



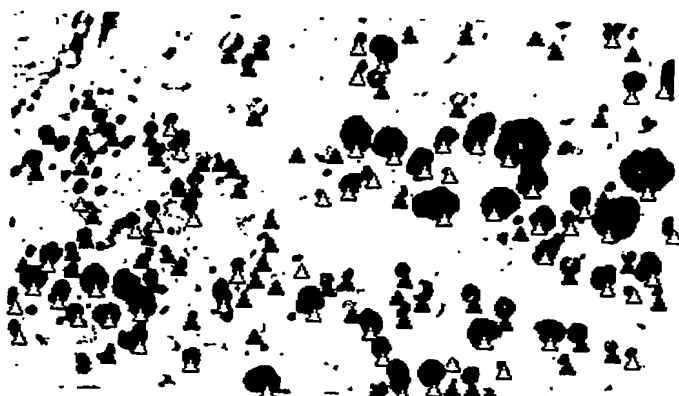


【図 6 b】

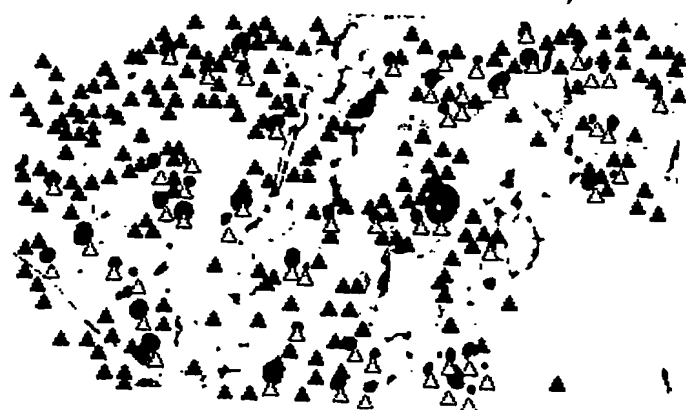
b-1)13KDaプロラミンアンチセンス遺伝子導入品種  
(N-LP13K-P9-ORFAS)



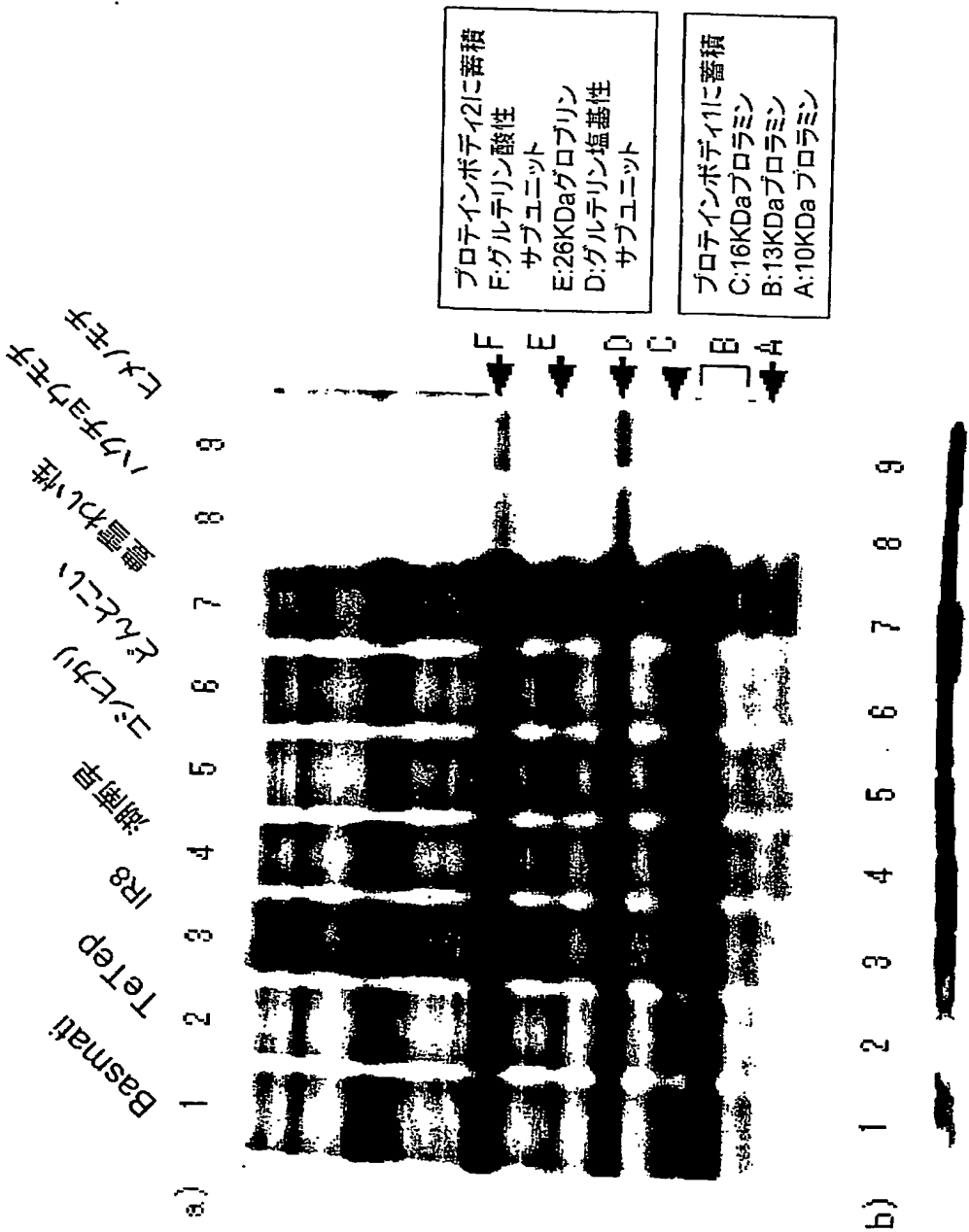
b-2)通常品種(日本晴)



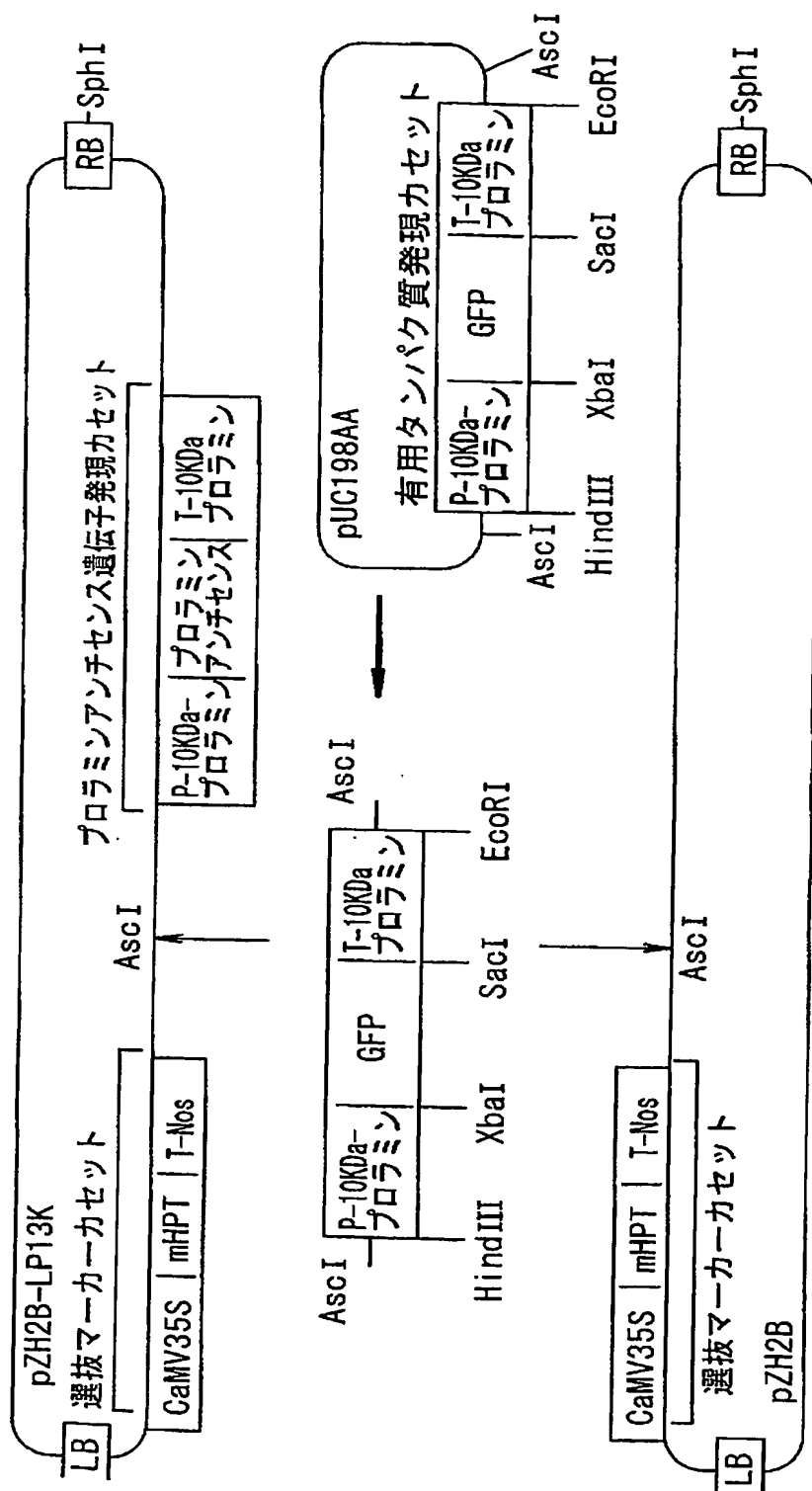
b-3)低グルテリンかつ高プロラミン品種(LGC-1)



【図7】



【図8】



【図 9 A】

## 13K プロラミン塩基配列比較

```

RM1. NUC      1:-----AG--GAAGCATAGTAGTAGAATCCTACAAAAATGAAGATCATTTT
RM4. NUC      1:--G--CAAA-ATAGAA--AG-ATC-----TAGTGTCCCGCAGCAATGAAGATCATTTT
RM5. NUC      1:CAATTCAAACATTATAGTTGAAGCATAGTAGTAGAATCCTACAAAAATGAAGATCATTTT
RM7. NUC      1:-----GAAGCATAGTAGTAGAATCCAACAACAATGAAGATCATTTT
RM9. NUC      1:--G--CAAA-AGCATA--AG-AAC-----TAGAAACCCACCACAATGAAGATCATTTT
               * * *          *** ** * *****

RM1. NUC      61:CGTATTTGCTCTCCTTGCTATTGTTGCATGCAA-CGCTTCTGCACGGTTTGATGCTCTTA
RM4. NUC      61:CGTCTTTGCTCTCCTTGCTATTGCTGCATGCAG-CGCCTCTGCGCAGTTTGATGTTTTAG
RM5. NUC      61:CGTATTTGCTCTCCTTGCTATTGTTGCATGCAA-CGCTTCTGCACGGTTTGATGCTCTTA
RM7. NUC      61:CGTATTTGCTCTCCTTGCTATTGTTGCATGCAATCGC-TCTGCGGGTTTGATCCTGTTA
RM9. NUC      61:CTTCTTTGCTCTCCTTGCTATTGCTGCATGCAG-TGCCTCTGCGCAGTTTGATGCTGTTA
               * * ***** ** ***** * *

RM1. NUC      121:GTCAAAGTTATAGACAATATCAACTACAATCGCATCTCCTGCTACAGCAACAAGTGCTCA
RM4. NUC      121:GTCAAAGTTATAGGCAATATCAGCTGCAGTCGCCTGTCTGCTACAGCAACAGTGCTTA
RM5. NUC      121:GTCAAAGTTATAGACAATATCAACTACAATCGCATCTCCTGCTACAGCAACAAGTGCTCA
RM7. NUC      121:GTCAAAGTTATAGGCAATATCAACTACAGTCGCATCTCCTACTACAGCAACAAGTGCTCA
RM9. NUC      121:CTCAAGTTTACAGGCAATATCAGCTGCAGCCGCATCTCATGCTGCAGCAACAGATGCTTA
               **** ** ** ***** ** ** *** * ** * ** ***** **** *

RM1. NUC      181:GCCCATGCAGTGAGTTCGTAAGGCAACAGCATAGCATAGTGGCAACCCCTTCTGGCAAC
RM4. NUC      181:GCCCATATAATGAGTTCGTAAGGCAACAGCATAGTGGCAACCCCTTCTGGCAAC
RM5. NUC      181:GCCCATGCAGTGAGTTCGTAAGGCAACAGCATAGCATAGTGGCAACCCCTTCTGGCAAC
RM7. NUC      181:GCCCATGCAGTGAGTTCGTAAGGCAACAGCATAGCATAGTGGCAACCCCTTCTGGCAAC
RM9. NUC      181:GCCCATGCGGTGAGTTCGTAAGGCAACAGTGCAGCACAGTGGCAACCCCTTCTTCCAAT
               ***** ***** *** *** ** ***** ***** ***

RM1. NUC      241:CAGCTACGTTTCAATTGATAAACAACCAAGTCATGCAGCAACAGTGTTGCCAACAGCTCA
RM4. NUC      241:CAGCTGCGTTTCAACTGAGAAACAACCAAGTC-TG--GCAACA--GCT--C-GC-GCT--
RM5. NUC      241:CAGCTACGTTTCAATTGATAAACAACCAAGTCATGCAGCAACAGTGTTGCCAACAGCTCA
RM7. NUC      241:CAGCTACGTTTCAATTGATAAACAACCAAGTCATGCAGCAACAGTGTTGCCAACAGCTCA
RM9. NUC      241:CACCCGTGTTTCAACTGAGAAACTGCCAAGTCATGCAGCAGCAGTGCTGCCAACAGCTCA
               ** * ***** *** **** ***** ** *** ** * * * * ***

```

## 【図 9 B】

RM1. NUC 301: GGCTGGTAGCGCAACAATCTCACTACCAGGCCATTAGTAGCGTTCAGGCGATTGTGCAGC  
 RM4. NUC 301: GG-TG—GCGCAACAATCTCACTATCAGGACATTAAACATTGTTCAAGCCATAGCGCAGC  
 RM5. NUC 301: GGCTGGTAGCGCAACAATCTCACTACCAGGCCATTAGTAGCGTTCAGGCGATTGTGCAGC  
 RM7. NUC 301: GGCTGGTAGCACAACAATCTCACTACCAGGCCATTAGTAGTTCAGGCGATTGTGCAAC  
 RM9. NUC 301: GGATGATCGCACAACAGTCTCACTGCCAGGCCATTAGCAGTGTTCAGGCTATTGTGCAGC  
 \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* \*\* \*\* \*  
 RM1. NUC 361: AACTACAGCTGCAGCAGGTCCGGTGT—GTCTACTTTGATCAGACTCAAGCTCAAGCTCAA  
 RM4. NUC 361: AGCTACAACCTCAGCAGTTTGGTGATC—TCTACTTTGATCGGAATCTGGCTCAAGCTCAA  
 RM5. NUC 361: AACTACAGCTGCAGCAGGTCCGGTGT—GTCTACTTTGATCAGACTCAAGCTCAAGCTCAA  
 RM7. NUC 361: AGCTACAACCTCAGCAATTTAGTGGT—GTCTACTTTGATCAGACTCAAGCTCAAGCTCAA  
 RM9. NUC 361: AGCTACGGCTACAACAGTTTGGT—AGCGTCTACTTCGATCAGAGTCAAGCTCAAGCTCAA  
 \* \*\*\*\* \*\* \*\* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 RM1. NUC 421: GCTTTGCTGGCCTTAAACTTGGCATCCATATGTGGTATCTATCCTAACTACTACATTGCT  
 RM4. NUC 421: GCTCTGTTGGCTTTAAAGTGCCATCTAGATATGGTATCTACCCTAGGTACTATGGTGCA  
 RM5. NUC 421: GCTTTGCTGGCCTTAAACTTGGCATCCATATGTGGTATCTATCCTAACTACTACATTGCT  
 RM7. NUC 421: ACTCTGTTGACCTTCAACTTGGCATCCATATGTGGTATCTACCCTAACTACTATAGTGGT  
 RM9. NUC 421: GCTATGTTGGCCCTAAACATGCCGTCAATATGCGGTATCTACCCAAGCTACAACACTGCT  
 \*\* \*\* \* \* \*\* \*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*  
 RM1. NUC 481: CCGAGGAGCATTCCCACCGTTGGTGGTGTCTGGTACTGAATTGTAATAGTATAATGGTTC  
 RM4. NUC 481: CCCAGTACCATTACCACCGTTGGCGGTGTCTTGAATGAGTTTAAACAGTATAGTGGTTC  
 RM5. NUC 481: CCGAGGAGCATTCCCACCGTTGGTGGTGTCTGGTACTGAATTGTAATAGTATAATGGTTC  
 RM7. NUC 481: CCCAGGAGCATTGCCACTGTTGGTGGTGTCTGGTACTGAATTGTAACAATATAATAGTTC  
 RM9. NUC 481: CCCTGTAGCATTCCCACCGTGGTGGTATCTGGTATTGAATTGTAGCAGTATAGTAGTAC  
 \*\* \* \* \*\*\*\* \*\* \* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \* \*\*\*\* \* \*\* \*  
 RM1. NUC 541: AAATGTTAAAAATAAAGTCATGCATCATCATGCGTGAC—AGTTGAAACTTGATGTC—ATA  
 RM4. NUC 541: GGAAGTTAAAAATAAGCTCAGATATCAT—ATATGTGACATG—TGAAACTT—TGGGTGATA  
 RM5. NUC 541: AAATGTTAAAAATAAAGTCATGCATCATCATGCGTGAC—AGTTGAAA—AAAAAA—AAA  
 RM7. NUC 541: GTATGTTAAAAATAAAGTCATACATCATCATGTGTGAC—TGTGAAACTTAGGGTC—ATA  
 RM9. NUC 541: AGGAGAGAAAAATAAAGTCATGCATCATCGTGTGACAAAGTTGAAACATCGGGGTGATA  
 \* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*  
 RM1. NUC 601: TAAATCTAAAT—AAA—C—TCGTGC—C—  
 RM4. NUC 601: TAAATAGAAAAAAGTTGTCTTTTATTTA—  
 RM5. NUC 601: AAA—  
 RM7. NUC 601: TAAATCTAAATAAATCATCTTAC—CTAAAAA—  
 RM9. NUC 601: CAAATCTGAATAAAATGTCATGCAAGTTTAAAC  
 \*\*

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

貯蔵タンパク質の総量を減少させる方法およびそのために必要な技術の開発、そのような方法によって開発された植物およびその種子、ならびにそのような植物および種子の利用法を提供すること

【解決手段】

プロラミンポリペプチドをコードする核酸配列に相補的な少なくとも15の連続する核酸配列または該相補的な少なくとも15の連続するヌクレオチド長を有する核酸配列に対して少なくとも約70%相同な核酸配列を含む、核酸分子。植物において種子中のタンパク質の発現量を減少させる方法であって、A) 請求項1に記載の核酸分子を提供する工程；B) 該核酸分子を該植物の細胞に導入する工程；C) 該細胞を再分化させてトランスジェニック植物を作出する工程；およびD) 該トランスジェニック植物から種子を得る工程、を包含する、方法もまた提供される。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号

[501203344]

1. 変更年月日

2001年 5月22日

[変更理由]

新規登録

住所

茨城県つくば市観音台3-1-1

氏名

独立行政法人 農業技術研究機構

2. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

名称変更

住所

茨城県つくば市観音台3-1-1

氏名

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**